

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE DU POUVOIR HÉMAGGLUTINANT DE NEUF SOUCHES DE VIRUS DES OREILLONS POUR DES HÉMATIES DE DIFFÉRENTES ESPÈCES

par R. SOHIER, G. FAVIER, Y. CHARDONNET et F. CHALLUT (*).

*(Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine de Lyon)*

Le pouvoir hémagglutinant du virus des oreillons a été largement utilisé pour son identification lors de son isolement, par inoculation à l'œuf de poule embryonné, et aussi, pour le diagnostic sérologique de l'infection ourlienne, par la mise en évidence des inhibiteurs spécifiques, depuis que Levens et coll. [1], Beveridge et coll. [2] ont prouvé son existence. Or, s'il était par la suite démontré que l'hémagglutinine était active, non seulement sur les hématies de poule, mais encore sur celles d'hommes (groupe O) puis de divers animaux (Beveridge et coll. [4], Enders [3]), il apparaissait aussi que l'aptitude à l'hémagglutination n'était pas la même pour les différentes espèces. Dans notre étude sur le diagnostic sérologique des oreillons, nous avons noté [5] les différences existant entre les hématies de poule, de cobaye et d'homme. Cabasso [6], dès 1950, avait attiré notre attention sur ces faits dont nous avons tenu compte d'ailleurs lors de la rédaction de notre ouvrage sur les méthodes de diagnostic des infections à virus [7]. Récemment, Cabasso et Cox [8] publiaient les résultats de leurs investigations et mon-

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 avril 1956.

traient les différences notables du pouvoir hémagglutinant de diverses souches de virus ourlien pour les hématies d'homme (groupe O), de poulet et de cobaye. Il s'agissait des souches aujourd'hui classiques de Enders (avec deux variantes E et He), de Habel (Ha) et d'une souche (Ja) isolée par les auteurs.

Il ressortait essentiellement de leur étude que, si le pouvoir hémagglutinant de la souche Enders (E) différait peu pour les diverses variétés d'hématies, par contre la souche Habel n'agglutinait pas les hématies humaines et moins les hématies de cobaye que celles de poule.

En outre, étudiant l'action de différentes températures sur l'hémagglutination, les auteurs montraient, en particulier, qu'à 37°, certaines différences apparaissaient, telle la suppression du pouvoir hémagglutinant de la souche Habel pour les hématies de poulet.

Nous nous sommes proposé d'apprécier le comportement de diverses souches de virus ourlien, en ce qui concerne leur pouvoir hémagglutinant sur diverses hématies, et l'action de différentes températures sur l'hémagglutination.

De telles investigations, d'ailleurs, n'ont pas qu'un intérêt théorique. Elles comportent des applications pratiques immédiates, ne serait-ce que pour le choix d'une méthode de diagnostic faisant intervenir l'hémagglutination, et par l'apport de renseignements utiles sur l'unicité ou la pluralité antigénique du virus des oreillons.

MATÉRIEL ET MÉTHODES UTILISÉS.

A. SOUCHES PROVENANT D'AUTRES LABORATOIRES. — Enders (désignée End...) remise par Cox et Cabasso (Section of Viral and Rickettsial Research, Lederle Laboratories Division, Pearl River, U. S. A.) adaptée à l'allantoïde, conservée à l'état lyophilisé depuis 1949, utilisée en mars 1955. Nombre de passages au moment de l'emploi : 44.

Habel (désignée Hab...) remise par Cox et Cabasso, adaptée à l'allantoïde, conservée à l'état lyophilisé depuis 1949, utilisée en novembre 1955. Nombre de passages au moment de l'emploi : 28.

L. K. (désignée L. K.) isolée par Wolff (Laboratory of Tropical Hygiene, Université de Leyde, Hollande) en 1949 de la salive d'un sujet atteint de parotidite ourlienne, conservée à l'état lyophilisé, cinquante-septième passage. Nombre de passages au moment de l'emploi : 60.

Gunst (désignée Gun...) isolée par Wolff du liquide céphalo-rachidien au cours d'une méningo-encéphalite ourlienne, conservée

à l'état lyophilisé après 15 passages. Nombre de passages au moment de l'emploi : 18.

B. SOUCHES ISOLÉES AU LABORATOIRE D'HYGIÈNE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON. — V. C. R. (désignée V. C. R.) isolée en mars 1951 du liquide céphalo-rachidien d'une méningite ourlienne secondaire. Hémagglutination faible au premier passage, nette au second. Adaptée à la cavité allantoïdienne au quatrième passage. Nombre de passages au moment de l'emploi : 25.

B. O. S. (désignée B. O. S.) isolée en février 1952 de la salive parotidienne au deuxième jour d'une parotidite. Nette hémagglutination [P] (1) au premier passage. Adaptation à la cavité allantoïque au quatorzième passage. Nombre de passages au moment de l'emploi : 22.

Chopin (désignée Chop..., isolée en février 1952 de la salive parotidienne au premier jour d'une parotidite. Nette hémagglutination (P) dès le premier passage, non adaptée à l'allantoïde. Nombre de passages au moment de l'emploi : 16.

Witzke (désignée Wit...) isolée en janvier 1954 de la salive au troisième jour d'une parotidite. Hémagglutination (P) au deuxième passage. Non adaptée à l'allantoïde. Nombre de passages au moment de l'emploi : 7.

Pachoud (désignée Pac...) isolée en octobre 1954 de la salive au deuxième jour d'une parotidite. Hémagglutination (P) dès le premier passage. Non adaptée à l'allantoïde. Nombre de passages au moment de l'emploi : 4 et 10.

Toutes les inoculations ont été faites dans la cavité amniotique, puisque toutes les souches n'étaient pas adaptées à la cavité allantoïque. Les liquides étaient conservés, dès prélèvement, en ampoules scellées, à 4° sous un volume de 0,3 ml permettant d'obtenir 3 ml de suspension au 1/10 et de contrôler cinq échantillons d'hématies.

Nous avons cru utile d'effectuer pour chaque titrage un contrôle de l'agglutinabilité des hématies par un virus grippal en raison de la grande stabilité habituelle de son hémagglutinine. (Il s'agissait d'une souche Lee 5394 aimablement remise par le Dr P. Lépine [Institut Pasteur de Paris] ayant subi cinq passages dans notre laboratoire.) Le liquide allantoïque infecté était conservé après addition de merthiolate (1/10 000 final) à 4°.

(1) Lire pour (P) hématies de poule.

C. HÉMATIES. — *Homme* : fournies par la même donneuse (2) saignée toutes les trois à quatre semaines, utilisées trois jours après leur prélèvement. Pour une recherche particulière (voir plus loin) nous avons utilisé le sang de dix donneurs.

Poule : Leghorn diverses provenant d'un centre de production. Hématies d'une seule poule, différente pour chaque épreuve, utilisées un à trois jours après le prélèvement.

Mouton : provenant du même mouton saigné toutes les trois semaines.

Cobaye : le même animal utilisé habituellement et saigné au plus toutes les trois semaines.

Les hématies sont recueillies et conservées en liquide d'Alsever (voir [7]) à 0°-4°. Elles sont lavées au moment de l'emploi trois fois dans la solution de Salk (voir [7]), 7,1-7,2, eau bi-distillée sur verre.

D. TECHNIQUE DE L'HÉMAGGLUTINATION. — Tubes 80 × 10 à fond rond. Suspension de virus à 1/10, 1/20... 1/1 280 répartie à raison de 0,25 ml par tube. Suspension d'hématies à 0,5 p. 100 dont on ajoute 0,25 ml à chaque tube. Portoirs placés sur la table du laboratoire (18°-22°) ou, si nécessaire, à 4° ou au bain-marie à 37°. Lecture après sédimentation de une heure trente pour les hématies de poule et deux heures pour celles de cobaye, deux heures trente pour celles d'homme et de mouton. Un témoin était fait pour chaque suspension et l'on contrôlait que la sédimentation y fût totale et normale.

RÉSULTATS.

Nous rapporterons nos constatations relatives au pouvoir hémagglutinant vis-à-vis de diverses hématies à la température du laboratoire de neuf souches différentes, et celles concernant l'action de diverses températures sur le pouvoir hémagglutinant de quatre souches.

POUVOIR HÉMAGGLUTINANT POUR DIVERSES VARIÉTÉS D'HÉMATIES. — Les résultats sont exposés dans la figure 1. Les titres donnés représentent la moyenne de quatre titrages effectués pour chaque souche.

On constatera essentiellement :

a) Que les hématies les plus agglutinables sont celles de poule.

(2) Nous tenons à remercier très sincèrement M^{lle} Garnier, infirmière, qui nous a aimablement donné le sang nécessaire à ces recherches.

b) Que le titre hémagglutinant pour les hématies de cobaye et de mouton est le même pour une souche donnée, sauf deux exception (L. K., différence d'ailleurs minime, et Hab...).

c) Que trois souches ont un pouvoir hémagglutinant identique

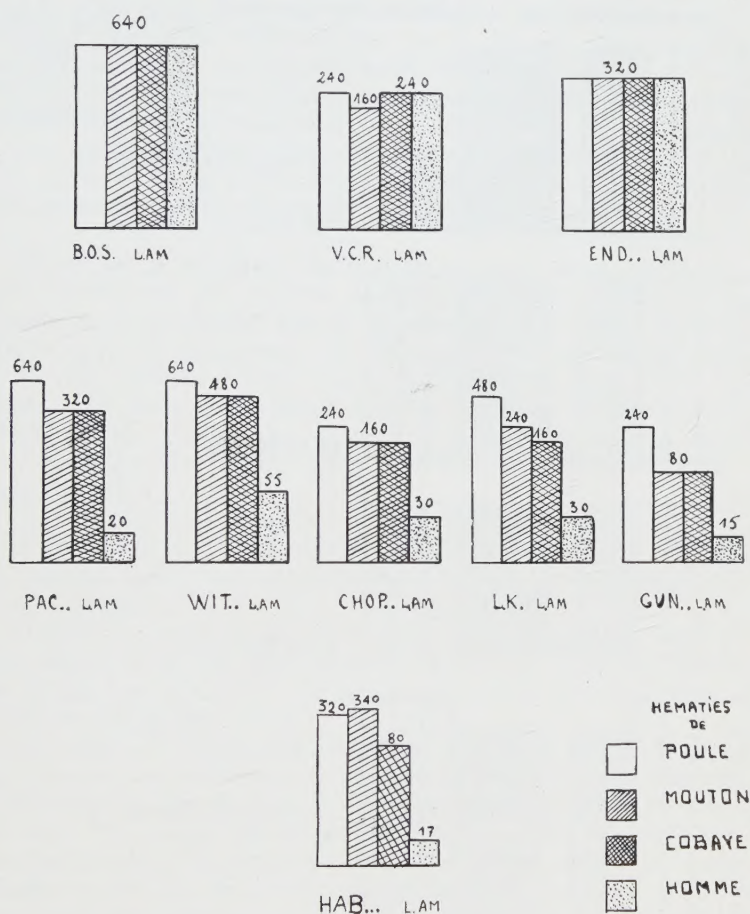


FIG. 1.

(End..., B. O. S.) ou à peu près identique (V. C. R.) pour les quatre variétés d'hématies.

d) Que six souches se distinguent des précédentes par leur faible pouvoir hémagglutinant pour les hématies humaines ; celui-ci est, par rapport au titre trouvé pour les autres variétés d'héma-

ties tantôt insignifiant (Hab..., Pac..., Gun...), tantôt très faible (L. K., Wit..., Chop...).

e) Que, parmi ces six souches dont l'hémagglutinine anti-humaine est faible, il en est (L. K., Gun..., Hab...) dont le

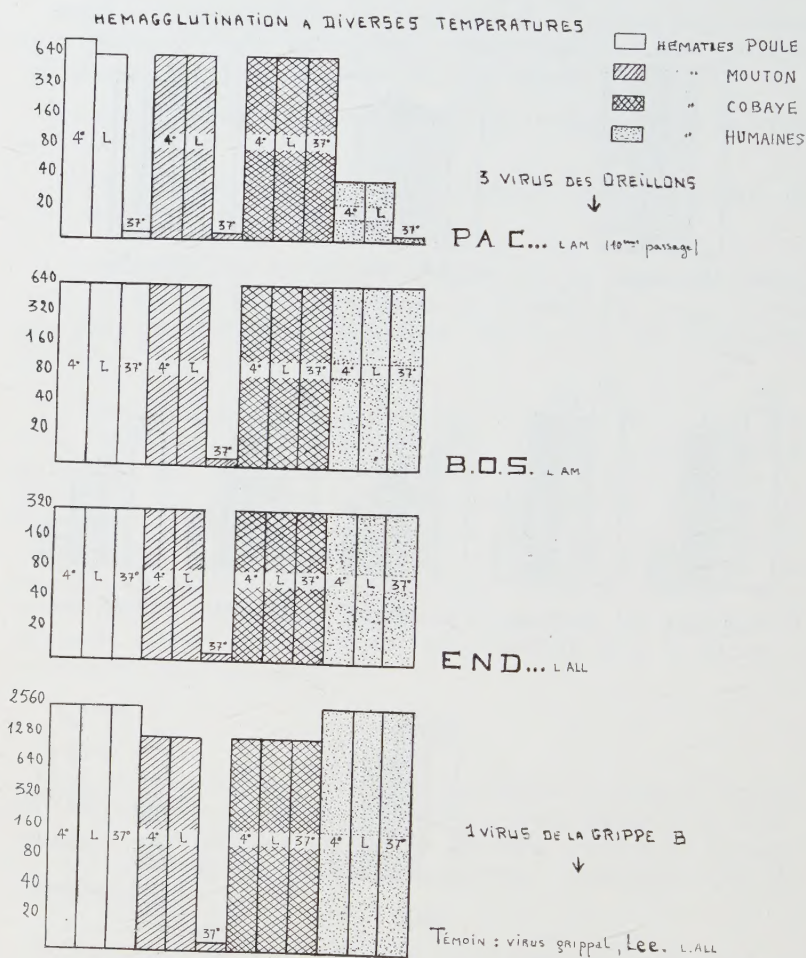


FIG. 2.

pouvoir hémagglutinant, jugé par rapport à celui noté pour les hématies de poule, est un peu plus faible pour les hématies de cobaye.

On aurait pu penser que les différences, observées quant au

pouvoir hémagglutinant de diverses souches, pouvaient tenir à des modifications subies au cours des passages sur œuf de poule embryonné, comme on en connaît pour le virus grippal (voir en particulier la revue générale de Hilleman [9]). On remarquera cependant (comme nous avons pris soin de le noter plus haut) que le nombre de passages qu'avaient subi les différentes souches utilisées était très différent de l'un à l'autre, sans qu'il soit possible d'établir un rapport entre ce nombre et les caractères de l'hémagglutination. Tout au plus peut-on noter que les souches isolées dans notre laboratoire ont subi moins de passages que celles qui agglutinent bien. Par contre, la souche Habel qui, elle aussi, avait un faible pouvoir hémagglutinant pour les hématies humaines, avait été passée de nombreuses fois sur œuf.

ACTION DE LA TEMPÉRATURE SUR LE POUVOIR HÉMAGGLUTINANT. — Les réactifs ont été répartis de façon identique, trois fois pour chaque virus et chaque variété d'hématies. Un portoir était laissé sur la table du laboratoire (18°-20°), un autre mis au bain-marie à 37°, le troisième placé dans un réfrigérateur à 3°-4°. Cette étude a été faite pour quatre souches de virus ourlien seulement (End..., Pac..., B. O. S., Hab...) et pour une souche témoin de virus grippal (Lee). Les résultats sont indiqués dans la figure 2.

On notera essentiellement :

a) Qu'aucun des virus ourliens étudiés n'agglutine les hématies de mouton à 37°, pas plus d'ailleurs que le virus grippal utilisé comme témoin.

b) Que les souches Pac... et Hab... se distinguent nettement des autres en ce que leur pouvoir agglutinant pour les hématies de poule est nul à 37° et très notablement diminué pour les hématies humaines.

Ces faits se rapprochent de ceux constatés par Cabasso [8]. On connaît les recherches de Overman et coll. [10] relatives à l'action de la température sur le phénomène d'hémagglutination. On doit citer aussi les études de Penttinen [11] qui, utilisant la souche Enders, note qu'en présence de liquide allantoïque normal (utilisé pour les dilutions) la température joue un rôle non négligeable sur l'hémagglutination qui débute à 28° et augmente ensuite. Spooner [13] a isolé une souche dont l'hémagglutinine était plus résistante que la souche Enders.

INFLUENCE DES HÉMATIES. — Elle ne nous a pas paru importante et, en particulier au cours d'études sur la conservation des hémagglutinines que nous rapporterons ultérieurement, le fait de changer d'hématies de poule n'a pas modifié les titres d'hémagglutinines. Nous avons d'ailleurs procédé à un contrôle effectué avec la

souche Habel sur trois variétés d'hématies. Nous n'avons pas trouvé de différences notables. Ces faits sont en contradiction avec ceux rapportés par Penttinen [41] qui estime que les hématies provenant de poulets différents peuvent, en présence d'un même liquide infecté (de même d'ailleurs qu'en présence de dilutions en liquide allantoïque normal) avoir des titres hémagglutinants différents.

Pour les hématies humaines, nous utilisons toujours la même donneuse, mais un contrôle effectué avec dix sangs différents (Be..., Bo..., Da..., Gar..., Gan..., Gi..., La..., Re..., Ri..., Ve..., tous du groupe O) donnait les mêmes titres hémagglutinants.

On pouvait se demander par ailleurs si les souches, qui différaient le plus entre elles par leur pouvoir hémagglutinant, avaient les mêmes propriétés antigéniques.

On sait qu'il a été admis jusqu'ici que le virus ourlien comportait un seul type antigénique ou, s'il existe quelques différences, que celles-ci sont minimes. Tout au plus, Hannoun [42] avait-il signalé en 1950 (sans d'ailleurs donner de précisions) que Wolff (3) aurait isolé une souche antigéniquement différente de celles connues jusque-là.

Nous avons utilisé, pour ce faire, l'épreuve de neutralisation sur tères antigéniques de quelques-unes des souches étudiées ci-dessus. Nous avons utilisé pour le faire l'épreuve de neutralisation sur œuf de poule embryonné, en prenant comme référence la souche Enders. Il est trop tôt encore pour donner des conclusions. Tout au plus, pouvons-nous indiquer qu'à ce jour il n'a pas été observé de différences notables.

RÉSUMÉ.

Il existe, ainsi que l'ont montré Cabasso et Cox, de notables différences quant au pouvoir hémagglutinant des souches de virus ourlien pour les hématies de diverses espèces.

Ayant étudié le comportement vis-à-vis des globules rouges d'homme, de poule, de cobaye et de mouton de 9 souches de virus ourlien isolées dans différents pays (2 aux Etats-Unis, 2 en Hollande et 5 à Lyon dans notre laboratoire), nous avons constaté que ces souches pouvaient être classées en deux groupes principaux :

a) Les unes (au nombre de trois), du type Enders, agglutinant au même titre les quatre variétés d'hématies ;

(3) Ce fait ne nous a pas été confirmé par Wolff, en particulier pour les deux souches qu'il nous a remises (L. K. et Gun...).

b) Les autres, du type Habel (au nombre de six), agglutinant faiblement (trois même très faiblement) les hématies humaines. En outre, trois de ces souches ont un pouvoir agglutinant faible pour les hématies de cobaye.

L'hémagglutination est influencée par la température, et notre étude fait apparaître les caractères essentiels suivants :

1° Disparition à 37° du pouvoir agglutinant pour des hématies de mouton chez toutes les souches ;

2° Disparition à 37° du pouvoir agglutinant pour les hématies de poule chez deux souches, l'une d'elles, à cette même température, n'agglutinant plus que faiblement les globules rouges humains.

Les hématies de donneurs différents humains ou animaux (poule) ne paraissent pas influencer le titre hémagglutinant, du moins quand on se réfère aux quelques contrôles effectués.

Des recherches sont en cours pour établir si ces différences notables du pouvoir hémagglutinant correspondent à une structure antigénique différente des virus ourliens. Les premières constatations seraient en faveur de l'unicité de ce virus.

SUMMARY.

The authors have studied the hemagglutinating capacity of 9 strains of mumps virus (from different countries) towards erythrocytes from man, chicken, guinea-pig and sheep. These strains can be classified into two groups :

a) The first group, Enders type (comprising 3 strains) agglutinates the four species of erythrocytes to the same titre.

b) The second group, Habel type (comprising 6 strains) feebly agglutinates human erythrocytes (3 of them very feebly). Moreover, 3 of these strains feebly agglutinate guinea-pig erythrocytes.

The hemagglutination is influenced by temperature. The species of the donors (man or animal) does not seem to influence the hemagglutinating titre.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEVENS (J. H.) et ENDERS (J. R.). *Science*, 1945, **102**, 117.
- [2] BEVERIDGE (W. I. B.), LIND (P. E.) et ANDERSON (S. G.). *Austral. J. exp. Biol.*, 1946, **24**, 15.
- [3] ENDERS (J. R.). In *Diagnostic Procedures for virus and rickettsial Diseases*. Amer. Publ. Hlth Assoc. Edit., New-York, 1948.
- [4] BEVERIDGE (W. I. B.) et LIND (P. E.). *Austral. J. exp. Biol.*, 1946, **24**, 127.
- [5] SOHIER (R.) et ESSER-TRIMBERGER (I.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 696.

- [6] CABASSO (V.) [Communication orale].
- [7] LÉPINE (P.) et SOHIER (R.). *Méthodes de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus*. Masson, édit., Paris, 1954.
- [8] CABASSO (V.) et COX (H. R.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **88**, 370.
- [9] HILLEMANN (M. R.). *Ann. Rev. Microbiol.*, 1954, **8**, 311.
- [10] OVERMAN (J. R.) et FRIEDEWALD (W. F.). *J. Immunol.*, 1949, **62**, 45.
- [11] PENTTINEN (K.). *Ann. Med. exp. Biol. Fenn.*, 1954, **32**, 71.
- [12] HANNOUN (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 175.
- [13] SPOONER (E. T. C.). *Monthly Bull. Minist. Hlth.*, 1952, **41**, 94.

LES ÉPREUVES DITES « BIOCHIMIQUES »
(ACTIONS ENZYMATIQUES ET RÉSISTANCE
A DES AGENTS INHIBITEURS)
POUR L'IDENTIFICATION DES STREPTOCOQUES

II. — RÉSULTATS (*)

par R. WAHL et P. MEYER (**).

(*Institut Pasteur*)

Les tableaux I et II rassemblent tous nos résultats concernant les actions enzymatiques et la résistance aux agents physiques et chimiques. Les chiffres indiquent, pour chaque groupe sérologique ou espèce et pour chaque réaction, le pourcentage des cas positifs. En outre, pour les fermentations, le nombre de croix indique l'intensité « moyenne » de la réaction, comme il a été expliqué dans la première partie de ce travail (1).

Les pourcentages correspondant à chaque réaction sont reportés sur des diagrammes (fig. 1 et 2), où, quand il s'agit d'une fermentation, le nombre de croix indiquant l'intensité moyenne est également reporté.

Ces résultats appellent les commentaires suivants.

I. — ACTIONS ENZYMATIQUES.

1° FERMENTATION DU LACTOSE (tableau I et fig. 1). — On voit que toutes les espèces examinées font fermenter le lactose avec une assez grande fréquence (55 à 100 p. 100) [moindre pour les streptocoques des groupes E et F, mais encore trop grande pour servir de test pour leur identification]. En particulier, *Str. salivarius* l'attaquait dans 85 p. 100 des cas, plus fréquemment que ne l'indiquent Sherman, Niven et Smiley [111]. Wagner [127], Hodge et Sherman [55]. Cette réaction ne peut donc servir à identifier

(*) La bibliographie sera publiée ultérieurement avec la troisième partie.

(**) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} mars 1956.

(1) *V. Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90,

aucune des espèces indiquées dans le tableau. Les observations anciennes de Ayers et Johnson [4, 5], de Fuller et Armstrong [37] indiquant l'absence de fermentation du lactose par les streptocoques d'origine « bovine » ou « équine » sont trop imprécises pour être prises en considération. Il reste le cas de *Str. equi*, généralement considéré comme n'attaquant pas le lactose (Hopkins et Lang [59], Fuller et Armstrong [37], Klimmer et Haupt [64]). Nous n'avons examiné que cinq souches pouvant appartenir à cette espèce, dont trois attaquaient le lactose ; nous ne pouvons donc pas avoir d'opinion sur ce sujet.

L'épreuve de la fermentation du lactose est donc applicable seulement au diagnostic de *Str. equi*, et encore avec des réserves.

II. — FERMENTATION DU MALTOSE (tableau I et fig. 1).

On voit que le maltose est fermenté par toutes les espèces avec une fréquence allant de 55 à 100 p. 100 des cas. Cette réaction n'a donc pas d'intérêt pratique.

III. — FERMENTATION DU SACCHAROSE (tableau I et fig. 1).

La fermentation du saccharose a été positive avec une fréquence allant de 60 à 95 p. 100 pour toutes les espèces examinées, sauf pour les streptocoques du groupe E (25 p. 100 de cas positifs seulement). Elle ne peut donc servir à identifier ces espèces, mais quand elle est négative, on doit penser soit au groupe E, soit à *Str. durans*, comme nous allons le voir.

Certains auteurs considèrent l'absence de fermentation du saccharose comme étant un caractère propre à *Str. durans* [116, 84]. N'ayant examiné que deux souches de *Str. durans* dont une fermentait le saccharose, nous ne pouvons pas avoir d'opinion sur ce point et nous admettons jusqu'à nouvel ordre que cette épreuve pourrait être conservée pour le diagnostic de *Str. durans*.

IV. — FERMENTATION DU MANNITOL (tableau I et fig. 1).

On voit que le *tréhalose* est fermenté avec une fréquence assez grande par presque toutes les espèces. Il y a peut-être exception pour les streptocoques des groupes E et M ; ceux que nous avons examinés n'ont pas attaqué le tréhalose. Il y aurait une autre exception pour les streptocoques du groupe C d'origine animale. Nous y revenons plus bas.

Il en est autrement du *sorbitol* qui n'est nettement attaqué que

par quelques espèces des groupes D et C. Les résultats étant soit négatifs, soit « douteux » pour le groupe E et pour *Str. bovis*, nous considérons, conformément à la règle énoncée plus haut, que les souches de ces deux espèces que nous avons examinées n'ont pas attaqué ce glucide.

C'est la réaction du couple tréhalose-sorbitol qu'il faut considérer. Nous en discuterons l'intérêt pour les groupes D, C, E et M.

a) GROUPE D. — Le tréhalose est attaqué par *Str. faecalis* et *Str. bovis*. Le sorbitol, pour Roemer, était attaqué par 23 souches du groupe D sur 46, sans discrimination d'espèce. Nous observons que, en séparant les résultats pour chaque espèce du groupe D, la fermentation du sorbitol est généralement positive pour *Str. faecalis* (70 p. 100 des cas) et qu'elle est négative pour *Str. bovis*. Ajoutons que Shattock n'a pas observé la fermentation du sorbitol par *Str. durans* et que Skadhauge admet que *Str. faecium* ne l'attaque pas. On peut donc considérer cette réaction comme différenciant *Str. faecalis* des autres espèces du groupe D.

b) GROUPE C. — Edwards [32] avait fait du couple sorbitol-tréhalose un test différentiel pour l'origine animale ou humaine de certains streptocoques du groupe C. *Str. C* animal donnerait : sorbitol + tréhalose —, et *Str. C* humain, le contraire.

Sur 14 streptocoques du groupe C isolés chez l'homme, 8 seulement répondaient à ce schéma ; et sur 5 souches d'origine animale, 2 seulement y répondaient. Il faudrait préciser la signification du schéma en examinant un plus grand nombre de souches. Il faudrait d'ailleurs discuter la légitimité de cette distinction entre C animal et C humain, étant donné que ni les fermentations, ni comme nous le verrons la fibrinolyse, ne permettent de délimiter ces deux espèces.

c) GROUPES E ET M. — L'absence de fermentation franche du tréhalose et du sorbitol par ces deux groupes, que nous constatons, pourra éventuellement être retenue si ce caractère est vérifié sur un plus grand nombre de souches.

VI. — FERMENTATION DE L'INULINE ET DU RAFFINOSE (tableau I et fig. 1).

Les espèces qui attaquent l'inuline sont rares, celles qui font fermenter le raffinose ne sont pas très nombreuses. D'où leur intérêt pour caractériser les quelques espèces qui les attaquent habituellement, d'autant plus que certaines ne sont pas sérologiquement groupables.

Ce couple de glucides était employé par Andrewes et Horder [1], puis par Broadhurst [14, 15] et par de nombreux auteurs, avant la connaissance des groupes sérologiques. Pour Sherman, Niven

TABLEAU I.

	LACTOSE	MALTOSE	SACCHAROSE	MANNITOL	TREHALOSE	SORBITOL	INULINE	RAFFINOSE	GLYCEROL	ARABINOSE	XYLOSE	AMIDON	ESCULINE	HIPPURATE	NH ₃
A	++ 65	+++ 80	+++ 75	0	+++ 95	0	0	+	+	0	0	++ 65	50	0	60
B	+++ 90	++ 80	+++ 80	0	++ 30	0	0	0	0	++ 10	0	+	20	80	90
C (hum.)	+++ 70	+++ 100	+++ 90	5	+++ 60	++ 5	+	++ 20	+	+	+++ 25	100	60	0	100
D faec.	+++ 100	+++ 100	+++ 70	+++ 90	+++ 100	+++ 70	0	0	++ 65	++ 40	++ 15	++ 90	100	0	95
D bovis	++ 100	+++ 90	+++ 90	++ 5	+++ 100	++ 10	++ 15	0	++ 5	++ 40	0	+++ 95	100	15	50
E	++ 30	++ 55	++ 25	++ 45	0	+	0	+	0	0	0	++ 45	70	0	70
F	+++ 30	++ 80	+++ 80	+++ 30	++ 90	0	0	0	0	0	0	++ 100	70	0	80
G	+++ 100	++ 70	++ 80	+++ 20	+++ 50	++ 10	0	+++ 50	0	0	0	+++ 40	40	0	90
H	+++ 80	++ 95	+++ 95	+++ 10	++ 90	++ 10	0	+++ 35	0	0	0	++ 90	90	0	50
K	++ 75	+++ 100	+++ 90	0	++ 35	0	0	++ 50	0	+	0	+++ 70	20	0	35
L	+++ 40	+++ 60	++ 90	0	+++ 65	0	0	+	++ 5	0	+	+++ 90	30	0	55
M	+++ 50	++ 65	++ 60	0	++ 20	0	0	0	0	0	0	++ 60	35	10	45
SALIV.	+++ 80	+++ 90	++ 85	0	++ 80	0	+++ 75	+++ 60	0	0	0	++ 30	85	0	40
SANG	++ 70	+++ 85	+++ 70	0	++ 70	0	0	+++ 30	0	0	0	+++ 70	65	0	75
MITIS.	++ 80	+++ 60	++ 65	+	++ 85	++ 5	++ 20	++ 25	+	++ 5	+	++ 40	75	15	55

et Smiley [144] ils étaient surtout intéressants pour différencier *Str. salivarius* d'autres espèces de streptocoques, et en particulier de *Str. mitis*. Nous y reviendrons.

Parmi les autres streptocoques non groupables, Mirick a cons-

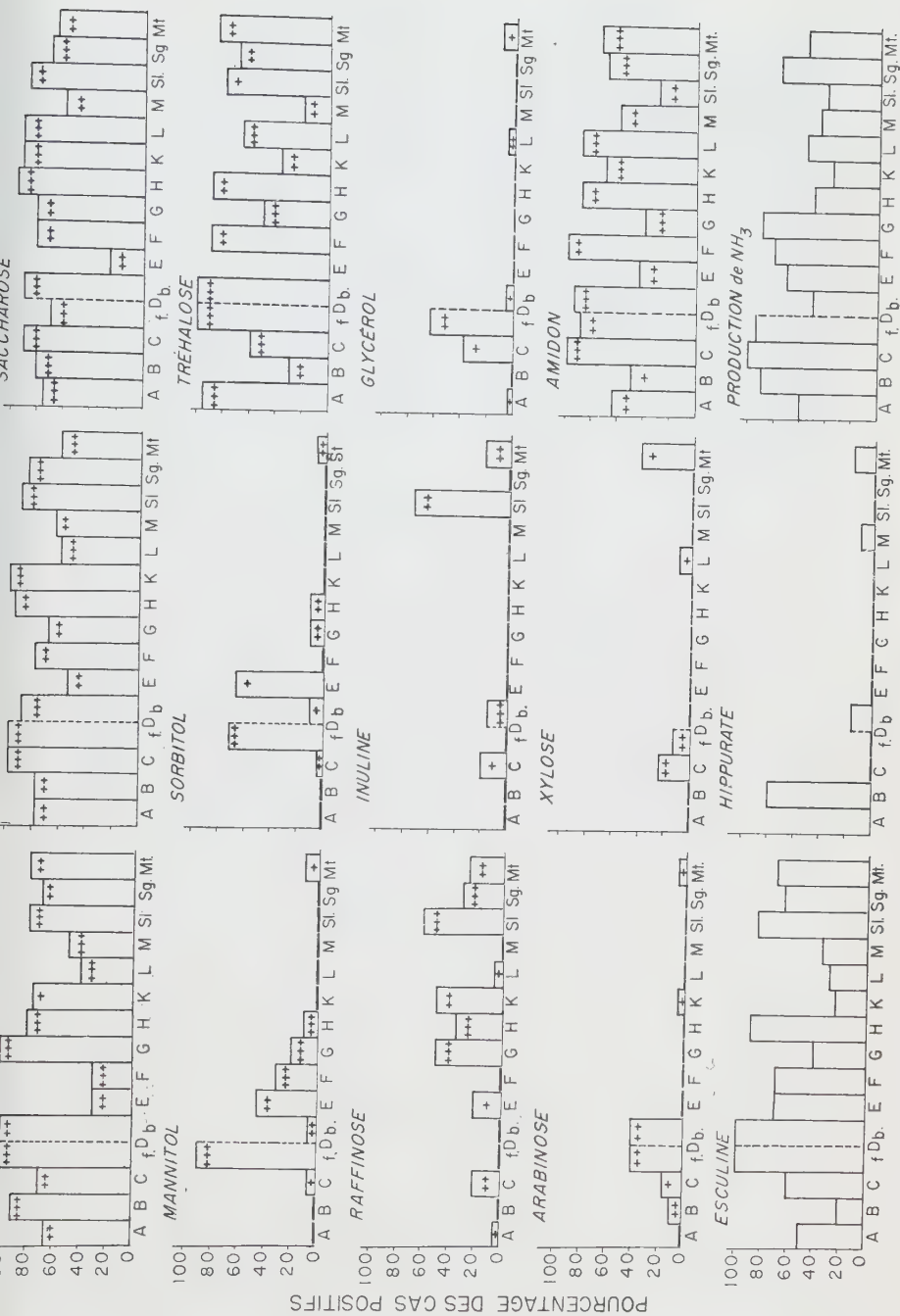


FIG. 1.

taté plus tard que *Str. M. G.* n'attaque pas ces glucides ; nous avons constaté, de plus, que *Str. sanguis* attaque assez souvent le raffinose (sept fois sur vingt et une).

Mais en réalité, l'accord n'est pas fait sur la classification des streptocoques non groupables. Ce n'est donc qu'après avoir indiqué celle que nous adoptons, que nous pourrions discuter ces résultats (voir troisième partie), en les confrontant avec ceux des cultures sur milieux hypersaccharosés.

Par ailleurs, deux espèces de streptocoques groupables, *Str. bovis* (groupe D) et les streptocoques du groupe B, attaquent parfois l'inuline. Nous ne tenons pas compte des résultats « douteux » du groupe C, suivant la règle adoptée. Quant à la fermentation du raffinose sans l'inuline, elle se voit dans beaucoup d'espèces, et, avec une assez grande fréquence, dans les groupes H et K.

VII. — FERMENTATION DU GLYCÉROL (tableau I et fig. 1).

Nous constatons que *Str. faecalis* attaque le glycérol dans 65 p. 100 des cas (si bien que la distinction d'une variété *glycerinaceus* ne se justifie pas), ce qui concorde avec les résultats donnés dans la littérature [18, 88, 92]. *Str. bovis*, autre espèce du groupe D, ne fermenterait pas le glycérol d'après les auteurs. Bien que ceci ne soit pas absolu (nous voyons que *Str. bovis* attaque le glycérol dans 5 p. 100 des cas), cette réaction est donc une de celles que l'on peut utiliser pour distinguer ces deux espèces du groupe D. On peut dire que ces deux espèces sont les seules à attaquer le glycérol, puisque nous négligeons les 40 p. 100 de cas « douteux » de *Str. C* humain.

VIII. — FERMENTATION DE L'ARABINOSE ET DU XYLOSE (tableau I et fig. 1).

L'arabinose est un sucre rarement fermenté. Il l'est par *Str. faecalis* et par *Str. bovis*, mais cette réaction ne peut pas les distinguer, car on l'observe avec la même fréquence (40 p. 100) et la même intensité (++) chez les deux espèces. Nous voyons que le xylose, encore plus rarement fermenté, ne donne pas non plus de renseignements significatifs. Ces deux sucres ne sont donc pas à utiliser dans la pratique.

IX. — FERMENTATION DE L'AMIDON (tableau I et fig. 1).

Parmi les nombreux auteurs [32, 64, 55, 102, 126, 134] ayant étudié les streptocoques *equi* et *faecalis*, certains attribuent à ces

germes le pouvoir de faire fermenter l'amidon soluble. Ceci est vrai dans 50 p. 100 des cas de notre statistique. Skadhaug [118] insiste sur la valeur de cette réaction pour l'identification des streptocoques du groupe L (de Fry) [= groupe N de Ernst], ce qui ne ressort pas de notre statistique.

X. — DÉCOMPOSITION DE L'ESCULINE
(tableau I et fig. 1).

On relève dans la littérature de nombreuses divergences, en fonction de la méthode employée. La principale raison en est qu'elle comporte trop souvent l'adjonction de sels biliaires au milieu. Nos résultats confirment ceux de Ehrisman [33] et de Roemer [92] : toutes les espèces, en l'absence de sels biliaires, font fermenter l'esculine avec une fréquence de 50 à 100 p. 100, sauf les streptocoques des groupes B et K (20 p. 100).

Ce test est utilisable seulement dans un cas particulier que nous verrons (Str. du groupe B à réactions sérologiques douteuses).

XI. — HYDROLYSE DE L'HIPPURATE DE SODIUM
(tableau I et fig. 1).

Cette réaction est considérée comme caractéristique de *Str. mastiditis* (groupe B) par tous les auteurs l'ayant étudiée, spécialement Plastring et Hartsell [87].

Nous avons en effet constaté que l'hippurate est habituellement hydrolysé par les streptocoques du groupe B. Cependant, d'une part, 20 p. 100 de nos souches du groupe B faisaient exception, d'autre part quelques streptocoques du groupe D ont également attaqué l'hippurate, ce qui concorde avec les observations de Seeleman et des auteurs de langue allemande, ainsi que celles de Hare [49] et de Hare et Maxted [50].

La réaction rend des services pour le groupe B au cas où des difficultés particulières se présentent, provenant par exemple d'une réaction sérologique douteuse, ou d'une réaction « biochimique » atypique pour ce groupe (par exemple : une réaction positive sur milieu hypersaccharosé).

XII. — FORMATION D'AMMONIAC (par désamination de l'arginine)
[tableau I et fig. 1].

La variété des techniques utilisées explique probablement les résultats contradictoires rapportés dans la littérature.

Pour Ayers, Rupp et Mudge [8], seules certaines souches de *Str. viridans* sont incapables de produire de l'ammoniac. Nos résultats ne le confirment pas et montrent que cette réaction n'a pas de valeur pratique.

XIII. — MESURE DU pH FINAL EN BOUILLON GLUCOSÉ.

Cette épreuve a été utilisée autrefois par Winslow et Palmer [134], Avery et Cullen [3]. Elle ne nous a pas donné de résultats significatifs.

XIV. — FERMENTATION DU GLUCOSE.

Signalons, pour être complet, qu'un certain nombre de nos souches n'attaquaient pas le glucose ; mais ceci n'a pas de valeur diagnostique.

XV. — LIQUÉFACTION DE LA GÉLATINE.

Ce test de protéolyse, que nous n'avons pas pratiqué systématiquement, a été préconisé par Orla-Jensen [85] et par la majorité des auteurs de langue anglaise comme caractère spécifique d'une variété de *Str. faecalis*, *Str. liquefaciens*. Nous reviendrons dans la troisième partie, à la Discussion, sur les différentes variétés de *Str. faecalis*.

XVI. — PRODUCTION DE MUCILAGES (tableau II)
EN MILIEUX HYPERSACCHAROSÉS.

Ces épreuves ont une importance toute spéciale pour l'identification des streptocoques sérologiquement non groupables, comme nous l'avons dit à propos de l'inuline et du raffinose. Mais cette identification suppose une définition des espèces correspondantes, sur laquelle l'accord est encore à faire. Pour cette raison, nous discuterons l'ensemble de la question dans la troisième partie.

XVII. — ACTION SUR LE LAIT TOURNESOLÉ.

Rappelons que le test du lait tournesolé est triple, car il comprend : l'acidification avec virage du tournesol, la coagulation du lait, la réduction du tournesol en leuco-dérivé. Rappelons que cette dernière n'a de valeur que si elle est précoce. C'est peut-être faute d'opérer toujours dans des conditions convenables et d'interpréter les résultats, que ceux-ci paraissent tellement contradictoires.

L'acidification indique seulement que la soucheensemencée a donné une culture. C'est le cas de presque toutes les espèces. Deux espèces cependant, *Str. equi* et *Str. acidominimus* (dont nous n'avons examiné qu'une seule souche), ne pousseraient pas dans le lait.

La coagulation était considérée par Andrewes et Horder [4]

(1906) comme permettant de distinguer *Str. salivarius* (+) de *Str. mitis* (—). Avec Hopkins et Lang [59] (1918), nous constatons qu'elle n'a pas de valeur diagnostique : nous voyons dans le tableau qu'elle est produite par la plupart des souches de toutes les espèces. Cependant les streptocoques des groupes E et F font exception dans notre statistique, et ce caractère négatif, joint à d'autres, pourrait contribuer à les identifier.

La recherche de la réduction est l'élément le plus important du test. Pour Sherman et Albus [108] les streptocoques « saprophytes » réduiraient plus souvent que les autres le tournesol et le bleu de méthylène.

De nombreux travaux ont été faits sur cette réaction. Ils sont souvent contradictoires, probablement à cause des différences de technique. C'est ainsi que pour Sherman, Niven et Smiley, les streptocoques du groupe H acidifient, coagulent et réduisent le lait tournesolé ; Hare observe le contraire. Sur 20 souches de ce groupe, nous n'avons jamais observé de réduction, les autres réactions étant variables.

Nos résultats sur la réduction du tournesol permettent de répartir les espèces examinées en trois catégories :

a) Une seule espèce, *Str. faecalis*, est dans la première. Elle est toujours fortement et « précocement » réductrice.

b) Les espèces qui n'ont jamais réduit le tournesol sont celles des groupes E, F, H, M et *Str. sanguis*.

c) Les autres espèces ne réduisent généralement pas le tournesol. Mais quelques souches, assez rares, peuvent être réductrices.

Résistance aux agents chimiques ou physiques

I. — BLEU DE MÉTHYLÈNE. (tableau II et fig. 2).

Ici également les contradictions résultent probablement de différences de technique. La plupart des chercheurs [14, 28, 5, 108] et surtout les auteurs de langue allemande, qui ont étudié le lait, emploient le lait à 0,1 et à 0,02 p. 100 de bleu de méthylène. D'autres comme Sikl et Wagner [417] emploient, au lieu du lait, du bouillon additionné de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène. Le temps d'incubation varie entre un et dix jours suivant les auteurs.

Il nous paraît essentiel de standardiser la technique, en employant seulement le lait au bleu à 0,1 et 0,02 p. 100, avec lecture après quarante-huit heures d'incubation.

Les souches résistantes donnent une culture, la réduction du bleu et la coagulation du lait.

Str. faecalis a donné ce résultat positif avec 0,1 p. 100 de bleu. Nous n'avons pas observé, comme Plummer [88] et Avery [2], que les streptocoques d'origine humaine soient plus sensibles que les autres à 0,1 p. 100 de bleu de méthylène. Les autres espèces ne

TABLEAU II.

	5% SACCH.		LAIT TOURNESOL			LAIT+B.M.				SELS BILIAIR.				NaCl		pH 9,6	CULTUR A		RÉSISTANCE A 60°	NOMBRE DE SOUCHES				
	LIQ.	SOL.	A	C	R	0,1%		0,02%		10%		2,5%		6,5%			2%				45°		10°	
						C	R	C	R															
A	-	-	95	60	5	0	20	30	60	0	45	0	80	0	0	0	0	0	43					
B	15% +	15% ++	85	85	10	0	5	20	20	35	95	10	95	0	15	0	0	12						
C (hum.)	-	-	60	55	5	10	15	80	80	50	100	0	95	0	0	0	0	14						
D faec.	-	-	100	100	95	85	95	100	100	95	100	95	100	95	100	90	100	78						
D bovis	7% +	7% ++	95	60	45	10	15	40	40	80	100	40	95	75	90	10	70	13						
E	-	-	75	0	0	0	0	40	45	0	40	0	80	0	0	0	0	11						
F	-	-	55	0	0	0	0	5	10	0	10	0	75	0	0	0	0	13						
G	-	-	85	30	5	0	0	60	70	5	90	0	95	0	5	0	0	10						
H	20% +	20% ++	70	60	0	0	0	40	40	0	65	0	70	0	65	0	0	20						
K	-	-	90	70	10	5	10	90	95	0	35	0	80	0	35	0	0	37						
L	-	-	85	80	10	0	5	40	40	0	80	0	85	0	15	0	0	10						
M	-	-	35	30	0	0	0	20	30	0	35	15	90	0	0	0	0	8						
SALIV.	+++	+++	90	75	10	0	10	40	35	25	90	0	95	0	50	0	0	12						
SANG.	+	++	85	80	0	0	0	40	45	45	80	10	100	0	65	0	0	21						
MITIS.	-	-	65	70	25	10	10	40	45	5	70	5	90	0	45	0	0	91						

donnent pas de cultures avec cette dose de bleu. Au contraire, en présence de 0,02 p. 100 de bleu, presque toutes les espèces donnent des cultures avec réduction et coagulation. Il semble que les streptocoques du groupe F fassent exception (résultats

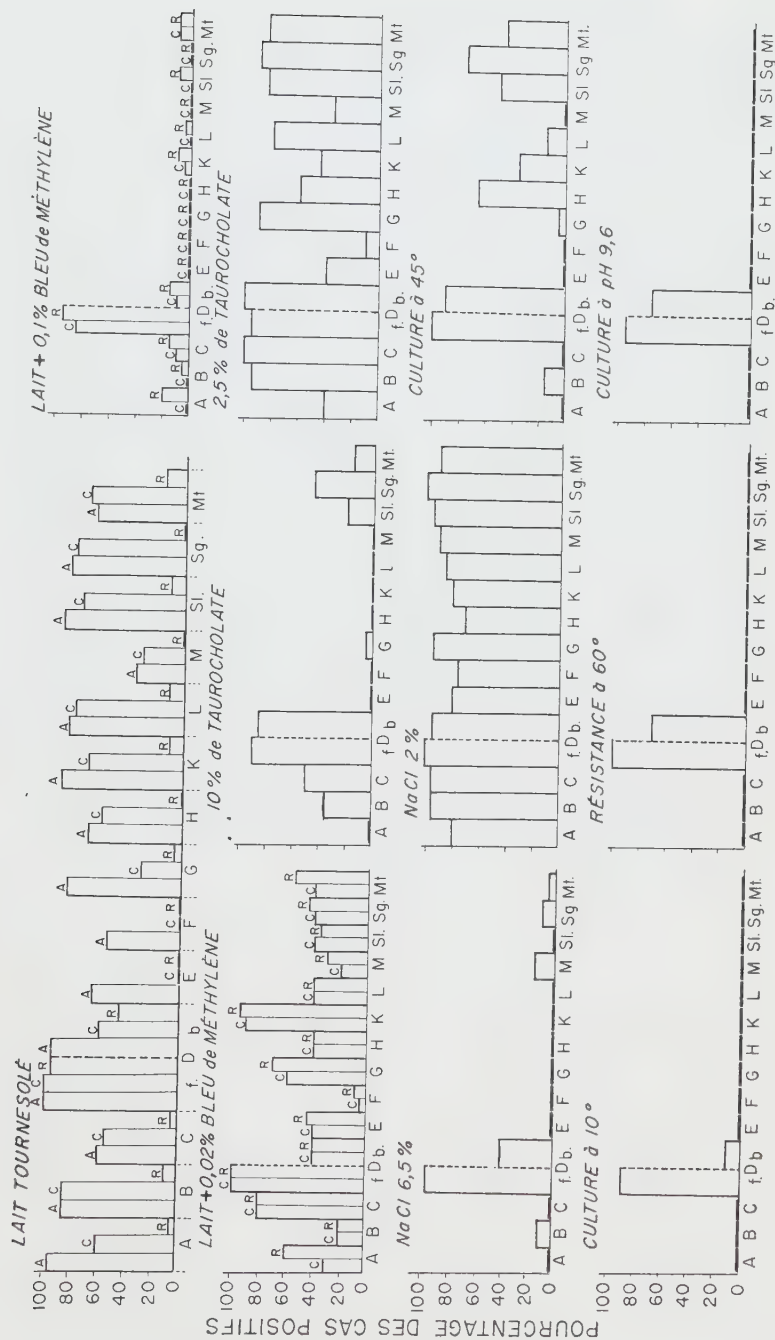


Fig. 2.

de 13 souches), et ce caractère négatif pourrait être utilisé pour cette espèce en cas de réaction sérologique douteuse.

II. — BILE ET SELS BILIAIRES (tableau II et fig. 2).

Nous avons vu que les résultats obtenus avec la bile et les sels biliaires dépendent de l'échantillon employé et du milieu de culture. Seuls les résultats obtenus en eau peptonée, d'une part avec un stock de bile (120 souches) et d'autre part avec les deux préparations de bile et sels biliaires (204 souches), ont servi à cette statistique (première partie, p. 12). Ils sont donc comparables entre eux, et obtenus, croyons-nous, dans de bonnes conditions ; mais ils ne peuvent être valablement comparés à ceux d'autres auteurs, qui ont opéré dans d'autres conditions.

De l'examen de nos chiffres, il résulte que :

1° La culture en eau peptonée avec 2,5 p. 100 de sels biliaires (équivalant à 10 p. 100 de bile) n'apporte guère d'éléments différentiels pour le diagnostic des espèces de streptocoques et doit être abandonnée.

2° La culture en eau peptonée à 10 p. 100 de sels biliaires (équivalant à 40 p. 100 de bile) est un caractère important de *Str. faecalis* et *Str. bovis*. Cependant, 30 p. 100 des souches des streptocoques des groupes B et C et de *Str. sanguis* y donnent aussi des cultures, ainsi que 10 p. 100 des *Str. mitis* et *salivarius*. En particulier, dans les cas où les réactions sérologiques avec le sérum D seraient douteuses ou croisées, ce caractère permettrait de les différencier des streptocoques des groupes H et K.

Mais la difficulté de se procurer des sels biliaires convenables diminue l'intérêt pratique de la réaction.

III. — MILIEUX HYPERCHLORURÉS.

Les auteurs ont utilisé diverses concentrations de chlorure de sodium, surtout 2 p. 100 et 6,5 p. 100, et des concentrations intermédiaires. Nous n'avons utilisé que les deux premières.

a) Le milieu à 2 p. 100 NaCl permet la culture de toutes les espèces (70 à 100 p. 100 des cas). Cette concentration doit donc être abandonnée.

b) Pour Weatherall et Dibble [129], Sherman et coll. [109], Ritzerfeld [90], Roemer [92] et la plupart des auteurs, l'ancien groupe des « entérocoques » (aujourd'hui *Str. faecalis*) est seul à donner une culture dans un milieu à 6,5 p. 100 de NaCl. Ils ne se prononcent pas sur les réactions des autres variétés ou espèces du groupe D. Nous avons constaté que *Str. bovis* se comporte dans ce milieu comme *Str. faecalis*.

c) Certains auteurs emploient d'autres taux de chlorure de sodium : Yanger et Sherman [136] utilisent par exemple une concentration de 4 p. 100 à laquelle pousserait *Str. lactis*, alors que *Str. cremoris* serait inhibé. Nous n'avons pas utilisé cette concentration, n'ayant pas examiné de souches du groupe N.

IV. — MILIEU A pH 9,6 (tableau II et fig. 2).

Rappelons que ce test est d'une exécution délicate, à tel point que le milieu préconisé par Shattock et Hirsch [104] est indispensable à sa réalisation. Cette épreuve est positive seulement pour les trois espèces du groupe D : pour *Str. faecalis* et *Str. bovis* (dans 95 et 75 p. 100 des cas respectivement, d'après notre statistique), et pour *Str. durans* (dans 100 p. 100 des cas, selon la littérature). Certains streptocoques du groupe N poussent à pH 9,2, d'après Seeleman [101].

V. — GÉLOE A 1/2 500 TELLURITE DE K.

Sur ce milieu le seul *Str. faecalis* pousse en vingt heures, généralement en colonies noires. Cette espèce est ainsi différenciée de *Str. faecium*, caractérisé par l'absence de croissance à cette concentration ainsi que par l'absence de fermentation du sorbitol (Shattock). Pour les autres espèces de streptocoques, la plupart des souches ne poussent pas et quelques-unes poussent tardivement et sans donner de pigment, ce qui confirme certains résultats de Skadhauge.

VI. — CULTURES A 45°, A 43° ET A 40° (tableau II et fig. 2).

Pour les cultures à 45°, nos résultats sont conformes en général à ceux de la littérature. Les espèces qui peuvent pousser à cette température se répartissent en deux catégories : a) les streptocoques du groupe D y poussent presque constamment : 100 p. 100 des *Str. faecalis* ; 90 p. 100 des *Str. bovis* et 100 p. 100 des *Str. durans* qui poussent même à 50°, d'où l'ancien nom d'*hemothermophilus* ; b) les streptocoques sérologiquement non groupables poussent très souvent à cette température, et ceux des groupes H et K avec une fréquence encore grande. Dans certains autres groupes (groupes B, G, L et groupe C (variété *equi*) on trouve, à titre exceptionnel, quelques souches poussant à 45°.

Les auteurs signalent que les streptocoques du groupe N ne poussent pas à 45°. La croissance de *Str. lactis* est observée à 43° par Sherman et Stark [112]. *Str. cremoris* ne donnerait pas de culture à 43°, ni même à 40° (Yanger et Sherman [136]). Nous n'avons pas utilisé les tests à 43° et 40°, n'ayant pas examiné systématiquement de streptocoques du groupe N.

VII. — CULTURE A 10° (tableau II et fig. 2).

Seules deux espèces du groupe D (*Str. faecalis* et *Str. durans*) et les streptocoques du groupe N poussent à 10°. Exceptionnellement, *Str. bovis* le fait aussi (Sherman et coll.). Ce test mérite d'être employé davantage, à cause de sa valeur indiscutable pour le diagnostic de *Str. faecalis*.

VIII. — THERMO-RÉSISTANCE [TRENTÉ MINUTES A 60°]
(tableau II et fig. 2).

Cette méthode a donné de très bons résultats pour caractériser les streptocoques du groupe D à Ayers, Johnson et Davis [5], à Orla-Jensen [85] et à la majorité des auteurs ayant étudié les streptocoques lactiques et *faecalis*.

Cependant il y a quelques résultats divergents dus probablement aux différences de technique. Roemer [92], ainsi qu'Orla-Jensen [85] et Sherman [105], trouvent 60 p. 100 seulement de *Str. faecalis* thermo-résistants et un nombre variable de streptocoques du groupe N paradoxalement résistants. Enfin, Roemer [92] trouve deux souches du groupe A résistant à 60° sur 214.

Les 78 souches de *Str. faecalis* et les 13 souches de *Str. bovis* que nous avons étudiées sont résistantes dans respectivement 100 et 70 p. 100 des cas. Quant à *Str. durans* il est toujours résistant à 60°. Rappelons que Sherman et Stark ont exploré la résistance à 65°, température à laquelle certaines souches de *Str. faecalis* résisteraient. Certaines souches de *Str. durans* (appelé autrefois *hemothermophilus* [115]) résisteraient à 62°5 et à 65°, ainsi que *Str. thermophilus*, dont certaines souches résistent à 70° [135].

Ce test est donc un de ceux qui sont les plus utiles pour l'identification des streptocoques du groupe D et pour celle de *Str. thermophilus*.

Test de fibrinolyse.

Cette épreuve, classiquement positive pour les streptocoques d'origine humaine des groupes A, C et G (Tillett [124], paraît actuellement moins fidèle [97, 96, 70, 75, 124] : la souche « Aronson » du groupe B, bien connue et beaucoup de souches des groupes B, C, F d'origine animale sont fibrinolytiques, mais avec une intensité relativement réduite. C'est pourquoi nous n'avons pas utilisé ce test.

★ ★

De l'ensemble des résultats précédents, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° Certaines épreuves ne paraissent pas avoir de valeur pra-

tique : fermentation de maltose, arabinose, xylose, amidon, production d'ammoniaque. Cultures avec 2,5 p. 100 de sels biliaries (équivalent à 10 p. 100 de bile), avec 2 p. 100 de NaCl.

2° *Certaines ont une valeur incontestable* : Fermentation du mannitol, du sorbitol, de l'inuline ; hydrolyse de l'hippurate ; formation de mucilages en milieux hypersaccharosés ; réduction du lait tournesolé ; culture sur tellurite de potassium ; culture en NaCl à 6,5 p. 100 et à pH 9,6 ; culture à 45° ; culture à 10° ; thermo-résistance à 60°.

3° D'autres enfin nous paraissent avoir une *certaine valeur, mais limitée*. Elles doivent être étudiées davantage avant d'être appliquées systématiquement.

Fermentation du lactose (*Str. equi*), du saccharose (*Str. durans* et peut-être les streptocoques du groupe E), du glycérol (distinction entre *Str. faecalis* et *Str. bovis*).

Décomposition de l'esculine (généralement négative pour le groupe B).

Epreuve du lait au bleu de méthylène :

A 0,1 p. 100 (positive seulement pour *Str. faecalis*) ;

A 0,02 p. 100 (négative pour les streptocoques du groupe F).

Culture en présence de sels biliaries, d'application limitée ; à cause de la difficulté d'obtenir un produit convenable.

4° Nous discuterons dans une prochaine publication les domaines d'applications des différentes épreuves.

**ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE
DES CONSTITUANTS DES VENINS DE SERPENTS
PAR LA MÉTHODE DE PRÉCIPITATION
EN MILIEU GÉLIFIÉ**

par E. GRASSET, E. PONGRATZ et T. BRECHBUHLER (*).

(Institut d'Hygiène de l'Université de Genève)

L'immunisation d'animaux de laboratoire, puis de chevaux au moyen de doses croissantes de venin de cobra, réalisée par Calmette (1894), de même que par Phisalix (1894) avec le venin de la vipère d'Europe, démontra que les principes toxiques contenus dans ces venins se comportaient comme des antigènes et provoquaient l'apparition dans le sérum de ces animaux de substances protectrices spécifiques, d'anticorps neutralisants envers les venins respectifs.

Ces observations confirmées depuis par de nombreux auteurs, et élargies à divers autres venins de colubridés et vipéridés, montraient également que ces processus de neutralisation des venins par les sérums antivenimeux homologues, pouvaient s'opérer aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

À l'intérêt immunologique de ces faits est associé un problème pratique non moins important : celui de l'appréciation de l'activité thérapeutique des sérums antivenimeux et des méthodes de titrage élaborées pour la détermination des propriétés neutralisantes de ces derniers envers les venins homologues ainsi que de ceux de serpents de parenté zoologique plus ou moins éloignée.

Les difficultés, voire même l'impossibilité rencontrée dans l'interprétation rationnelle des phénomènes d'interaction *in vitro* des éléments antigènes-anticorps venimeux, ont conduit à l'emploi, dans ces techniques de titrage, d'animaux d'expériences sensibles à l'action des venins (pigeons, lapins, cobayes, souris), auxquels sont injectés, après une période de contact, les mélanges

(*) Manuscrit reçu le 10 mars 1956.

venin-sérum antivenimeux, selon des proportions variables de ces deux éléments. Alors que la neutralisation par une quantité suffisante de sérum antivenimeux d'un nombre élevé de doses mortelles de venin, assurera la survie de l'animal injecté, la présence éventuelle dans ces mélanges de principes toxiques venimeux, incomplètement neutralisés, se traduira par des signes d'intoxication et des lésions pathognomoniques pour le venin considéré (tels que paralysie pour les venins de cobras ; hémorragies, action nécrosante, coagulante, pour les venins de vipères), de caractère d'autant plus grave, voire mortel, que la quantité de venin non neutralisée est plus importante.

Au cours de recherches sur les modalités d'interaction *in vitro* du venin de cobra et du sérum homologue anti-*Naja naja*, Lamb (1904), puis Calmette et Massol (1909) observaient un phénomène de précipitation dans certaines zones de la gamme des mélanges. Selon les conclusions de ces derniers, « il en résulte que cette réaction précipitante peut servir à mesurer approximativement *in vitro* la valeur antitoxique d'un sérum antivenimeux ».

L'observation de ce phénomène de floculation a été confirmée par de nombreux auteurs, tant dans les mélanges de sérums antivenimeux avec les venins homologues de divers colubridés ou de vipéridés, qu'avec certains venins hétérologues. Néanmoins, des réserves ont été exprimées par la plupart des auteurs quant à la possibilité d'utiliser ce phénomène comme moyen de mesurer l'activité des sérums antivenimeux, étant donné les irrégularités et même les écarts parfois considérables observés entre les résultats obtenus par la floculation et ceux enregistrés après l'injection des mêmes mélanges à des animaux d'expérience. Rappelons à ce propos les expériences de Lamb (1905) avec le venin et le sérum anti-*Vipera russellii* des Indes, ainsi que de Ghosh et Kundu (1936), d'Arantes, Karmann et Bier (1944-1945) et de Bier (1944-1945) avec le venin de *Crotalus terrificus* d'Amérique du Sud, et celles plus récentes de Schöttler (1955) avec ce même venin et le sérum spécifique ; de Cesari et Boquet (1936, 1937) relatives au venin et au sérum anti-*Cerastes cornutus* d'Afrique du Nord, ainsi que pour le venin et sérum homologue anti-*Vipera aspis* d'Europe (1935, 1937) ; citons également les expériences de Muic et Piantanida (1954) relatives au sérum anti-*Vipera ammodytes* des Balkans. Les études effectuées par Grasset et coll. (1935), Grasset (1945 et 1955) sur le venin de *Bitis arietans* et de *Naja flava* d'Afrique et les sérums homologues ont mis en évidence soit une, soit plusieurs zones de floculation dans la gamme des mélanges venin-sérum spécifique, mais dont l'interprétation indicatrice des propriétés neutralisantes est souvent rendue délicate par une superposition des diverses zones de

floculation. Ces zones correspondent aux conditions d'équivalence de certains des constituants antigéniques de ces venins.

Dans des travaux récents, Christensen (1953), en soumettant les floculats apparus à trois niveaux dans les mélanges de venin de *Naja flava* et de sérum homologue, chauffé à 70° pendant dix minutes à pH 2, a pu, par ce procédé, isoler trois fractions thermostables, α , β , γ , contenues dans la neurotoxine cobraïque.

De ces travaux il ressort que, si les phénomènes de floculation dans les mélanges venin-sérum homologue ne se prêtent pas à une interprétation quantitative de l'activité des sérums antivenimeux, ils reflètent néanmoins bien des caractères immunologiques spécifiques pour chaque venin, correspondant aux divers principes antigéniques entrant dans la constitution de ces derniers.

En élargissant pour un venin donné, tel que pour celui de *Bitis arietans*, les limites de la gamme des mélanges venin-sérum homologue, on observe, après des temps variables, l'apparition de zones distinctes d'opalescence suivie de phénomènes de floculation qui se produisent indépendamment les uns des autres et après des périodes de contact également différentes. Ces zones d'opalescence et de floculation s'étalent peu à peu dans des limites plus ou moins larges, elles sont susceptibles de confluer, et même de chevaucher et de se recouvrir plus ou moins rapidement. L'occurrence de tels faits rend l'interprétation de ces phénomènes de floculation encore plus délicate, voire même impossible.

Dans le but de parer à ces difficultés et de pouvoir étudier au ralenti les phénomènes d'interaction des constituants antigéniques et des anticorps venimeux homologues, nous nous sommes proposé de les réaliser en milieu semi-solide. Nous avons donc incorporé les venins et sérums antivenimeux dans un milieu gélifié, selon la méthode d'Oudin (1946), sous sa forme originale en tube, ainsi que selon la technique modifiée par Ouchterlony (1948) de double diffusion en plaque de gélose.

L'application de ces méthodes immuno-chimiques aux recherches sur des antigènes de diverses natures, tels que ceux d'origine bactérienne, des toxines microbiennes, des protéines animales et végétales, a mis en valeur la grande sensibilité et la spécificité de ces techniques.

Nos premiers travaux ont porté sur le venin de *Vipera aspis* d'Europe et sur le sérum homologue. Nous avons ensuite élargi nos études aux venins et sérums antivenimeux homologues suivants, qui nous ont été fournis gracieusement par les directeurs des instituts producteurs des sérums antivenimeux indiqués ci-dessous et auxquels nous désirons exprimer ici nos remerciements.

VIPÉRIDÉS.

Vipera aspis (Institut Pasteur de Paris et récolte personnelle).

Vipera ammodytes (Institut central d'Hygiène de Zagreb).

Vipera russellii (Institut Haffkine, Inde).

Bitis arietans (South African Institute for Medical Research, Johannesburg, Union sud-africaine).

Bitis gabonica (Institut Pasteur de Brazzaville, Afrique équatoriale française).

CROTALIDÉS.

Ancistrodon rhodostoma (Institut Pasteur de Bandung, Indonésie).

Bothrops jararaca (Institut Butantan, Sao Paulo).

Lachesis okinavensis (Turkestan).

Lachesis flavoviridis (Turkestan).

Crotalus atrox (Institut Vital Brazil, Niteroi, Brésil).

Crotalus terrificus (Institut Vital Brazil, Niteroi, Brésil).

Lachesis atrox (Institut Butantan, Sao Paulo).

ELAPIDÉS.

Naja naja (Institut Haffkine, Bombay, Inde).

Bungarus fasciatus (Institut Haffkine, Bombay, Inde).

Naja flava (South African Snake Farm, Fishhoek, Union sud-africaine).

Sepedon haemachates (South African Institute for Medical Research, Johannesburg, Union sud-africaine).

Dendraspis angusticeps (South African Institute for Medical Research, Johannesburg, Union sud-africaine).

Pour chacun des venins susmentionnés, nous avons procédé à des recherches détaillées de phénomènes d'interaction avec le sérum homologue. Au moyen de cette technique, nous avons pu mettre en évidence les principales fractions antigéniques constituantes de ces divers venins par leur représentation sous forme de précipitation linéaire spécifique, résultant de leur combinaison avec l'anticorps homologue contenu dans l'antisérum spécifique. Nous avons procédé également à des tests dans lesquels nous avons introduit, en plus du venin et du sérum homologue, divers autres venins provenant d'espèces de serpents de parenté plus ou moins éloignée. Notre intention était de mettre en évidence, par cette méthode, des phénomènes d'interaction, de neutralisation croisée ou de groupe, et de mettre éventuellement en évidence des éléments antigéniques communs ou proches, contenus dans divers venins de vipéridés ou de colubridés appar-

tenant à une même famille, ou provenant de représentants zoologiquement ou géographiquement éloignés.

TECHNIQUE.

Après divers essais nous nous sommes arrêtés à la technique suivante : un gel de gélose contenant 2 p. 100 d'agar-agar, 0,5 p. 100 de NaCl et 1 : 10 000 de merthiolate, de pH 7,5 est coulé dans des boîtes de Petri sur une épaisseur de 3 à 4 mm ; dans des cupules de 6 à 8 mm de diamètre, creusées dans la gélose solidifiée et distantes de 18 à 20 mm les unes des autres, on introduit d'une part les solutions en eau physiologique des venins à étudier en concentrations variables, et d'autre part le sérum antivenimeux. La température est dès lors maintenue constante à + 16°-+ 18° pendant toute la durée de l'expérience pour éviter les artéfacts éventuels que des variations de température peuvent entraîner (accidents du type Liesegang).

Après quelques jours (généralement 3 à 4), on voit apparaître dans la couche de gélose comprise entre les cupules, des précipités opaques en forme de lignes. La position de ces lignes de précipités entre les deux centres de diffusion de l'antigène (venin) et des anticorps (sérum antivenimeux homologue) dépend de divers facteurs dont l'étude a été faite par Oudin (1955), Ouchterlony, Kaminski et d'autres auteurs. En principe, c'est au lieu des points atteints par diffusion où l'antigène et l'anticorps correspondants sont à l'équivalence, qu'apparaît le précipité en forme de ligne fine ou d'une bande plus ou moins large et diffuse suivant les cas. Ces formations sont encore influencées par d'autres facteurs, tels que constantes de diffusion, et de la proportion et nature des antigènes et anticorps en présence. Ces lignes présentent généralement une position fixe ; quelquefois elles migrent au cours du temps, généralement dans la direction de la cupule renfermant les anticorps. Quand on examine une préparation de composition antigénique complexe, comme c'est le cas pour les venins, on ne peut guère s'attendre à ce que, vis-à-vis d'un antiserum donné, on soit en même temps et au même point de la gélose à l'équivalence pour les différents systèmes précipitants ; il se produit pour ces raisons, dans la couche de gélose intermédiaire, tout un spectre de lignes de précipité plus ou moins parallèles. On peut admettre en première approximation que le nombre de lignes qui apparaît correspond à autant de principes antigéniques distincts contenus dans le venin. Pour mettre en évidence, sinon la totalité, du moins la majorité des systèmes précipitants, on est souvent obligé de faire des essais avec toute une gamme de concentrations du venin et de l'antiserum envisagés : en effet, les précipités ne se forment qu'aux

points où les proportions antigènes-anticorps correspondants sont proches de l'équivalence. Des précipités qui se sont initialement formés peuvent parfois s'estomper, voire disparaître par dissolution dans un excès soit de l'antigène, soit des anticorps.

Dans leurs études sur les ovalbumines et sur les protéines sériques, Grabar et Burtin (1955) ; Kaminski (1954), et d'autres auteurs, ont montré que certaines réserves doivent être faites quant à la correspondance exacte entre le nombre de lignes de précipités et le nombre de systèmes précipitants. En tenant compte de ces réserves, nous admettrons par analogie que le nombre de lignes qui apparaît avec les venins correspond à au moins autant de systèmes antigéniques spécifiques distincts présents dans le venin étudié ; en effet, une ligne de précipité apparemment simple peut provenir de la superposition de plusieurs complexes ; dans ce cas, en faisant varier les proportions des éléments en présence, on peut voir la ligne de précipité primitivement unique, se résoudre en plusieurs composantes.

La méthode d'Ouchterlony permet, en plus du dénombrement des composants antigéniques, de comparer deux antigènes (dans le cas présent deux venins) entre eux ; il suffit pour cela de les introduire individuellement dans deux cupules voisines et d'observer si contre un antisérum homologue de l'un d'eux, les lignes de précipités que l'on voit se dessiner se prolongent exactement et forment des lignes continues pour les deux venins, ou si elles se croisent sans s'influencer, ou encore si deux lignes se juxtaposent, mais présentent à leur jonction une effilure (dirigée vers l'antigène hétérologue), ou enfin si aucune ligne de précipité ne devient apparente. Ces constatations permettent de distinguer les quatre possibilités suivantes :

1° Identité totale des deux antigènes (ex. venins de *V. aspis* de deux provenances et sérum anti-*V. aspis*).

2° Identité partielle (c'est-à-dire présence de certaines fractions antigéniques communes aux deux antigènes tel qu'il est observé pour les venins de *V. aspis* et *V. ammodytes*).

3 a) Non-identité des antigènes (ex. venin de *B. arietans* et de *N. flava*) opposés au sérum homologue bivalent. Les faisceaux de lignes résultant de la précipitation spécifique des antigènes contenus dans chacun des deux venins avec le sérum bivalent s'entrecoupent sans s'influencer respectivement.

3 b) Venins de *N. flava* et de *V. aspis* et sérum anti-*V. aspis*. Absence de phénomènes de précipitation dans le champ correspondant au venin de *N. flava* et au sérum anti-*V. aspis*.

Influence de la concentration des constituants antigéniques et des anticorps homologues sur les phénomènes de précipitation. Lorsque le venin de *V. aspis* est examiné selon les méthodes

immunochimiques décrites, il donne en opposition au sérum anti-venimeux homologue un spectre formé de quelque 9 à 10 lignes de précipités distinctes, correspondant au moins à autant de constituants antigéniques différents. La figure 1, planche I, illustrant ce phénomène, montre clairement la nécessité qu'il y a pour le dénombrement des constituants antigéniques par ce procédé, de faire réagir le venin à diverses concentrations envers une concentration fixe du sérum homologue, afin que la majorité des antigènes qu'il contient puisse être révélée individuellement par des phénomènes de précipitation.

Dans la présente expérience, nous avons utilisé une concentration unique à 50 p. 100 en eau physiologique, de sérum anti-*V. aspis* (ER, Institut Pasteur de Paris ; 1 ml neutralise plus de 1 mg de venin *V. aspis*) et dont un volume de 0,2 cm³ a été introduit dans la cupule centrale. Par ailleurs, des volumes identiques de 0,2 cm³ de 6 concentrations décroissantes d'un même venin de *V. aspis* et correspondant respectivement à 20, 10, 5, 2,5, 1 et 0,5 mg de venin sec par millilitre (dilué en solution physiologique) ont été introduits dans les 6 cupules périphériques. L'observation après un à quatre jours de diffusion montre l'apparition de phénomènes de précipitation, se traduisant par un ensemble de lignes, dont le nombre et l'emplacement dans le champ de diffusion varient selon la concentration de la solution du venin opposée à la solution de l'antisérum. De l'examen de cet immunogramme, il ressort que, selon les concentrations de venin utilisées, on sera à même de mettre plus ou moins aisément en évidence tel ou tel constituant antigénique par la formation d'un précipité antigène venimeux-anticorps distinct.

L'exécution d'épreuves semblables, appliquées à divers venins opposés à leurs sérums homologues, nous a convaincus de l'importance qu'il y a à faire varier dans les tests immunochimiques les proportions des deux réactifs antigène-anticorps, afin d'obtenir une mise en évidence adéquate aussi complète que possible de la mosaïque antigénique variable selon les venins, et de pouvoir retirer ainsi une appréciation rationnelle des spectres de précipitation fournis par cette méthode.

De l'opposition dans des conditions semblables du venin de *V. ammodytes* et du sérum homologue (préparé et purifié par la méthode enzymatique de Pope à l'Institut Central d'Hygiène de Zagreb), il résulte la formation de quelques 12 à 14 lignes de précipitation distinctes et bien marquées. Ces phénomènes de précipitation sont visibles dans l'immunogramme représenté dans la figure 2, planche I, dans lequel sont opposés le venin de *V. ammodytes* et le sérum homologue, et dans des concentrations équivalentes, le venin de *V. aspis* et le sérum homologue, de façon à pouvoir mettre en évidence les précipitations linéaires se pro-

duisant entre les venins et sérums homologues ainsi que celles formées entre ces venins et les sérums hétérologues.

L'examen comparatif des champs de diffusion du sérum anti-*V. ammodytes* montre des ensembles de tracés linéaires tout aussi marqués et aussi distincts envers le venin de *V. ammodytes* qu'envers le venin de *V. aspis*, mais de nombre plus réduit pour ce dernier. Certaines de ces lignes apparaissent en continuité pour les deux venins, traduisant ainsi la présence de principes antigéniques communs à ces deux venins.

On peut en outre remarquer nettement, dans le champ correspondant à *V. ammodytes*, la présence de 2 à 3 lignes absentes dans le champ de *V. aspis*, et qui coupent le faisceau de lignes de ce dernier venin.

La mise en évidence par ces phénomènes de précipitation en gélose d'un spectre antigénique plus complexe pour le venin de *V. ammodytes*, cadre d'ailleurs parfaitement avec les faits expérimentaux connus. La présence de principes antigéniques supplémentaires dans le venin de *V. ammodytes* est en effet démontrée par le fait que son activité toxique n'est pas neutralisée complètement dans les essais de neutralisation croisée du venin de *V. ammodytes* par le sérum anti-*V. aspis* ; d'où la nécessité qui est apparue de préparer un sérum anti-venimeux thérapeutique spécifique à l'égard de *V. ammodytes*.

Le sérum de cheval immunisé au moyen de ce venin neutralise en revanche totalement le venin de *V. aspis*.

Les précipitations linéaires, apparues dans ce même immunogramme entre le sérum anti-*V. aspis* et le venin de *V. aspis* et de *V. ammodytes*, peuvent se superposer de près par leur nombre et distribution à celles décrites plus haut pour le sérum anti-*V. ammodytes* envers ce même venin de *V. aspis*.

Bien qu'en raison de la nature différente du sérum anti-*V. aspis* utilisé — dans ce cas un sérum naturel — et du titre de neutralisation sensiblement inférieur à celui du sérum anti-*V. ammodytes* purifié, la situation des lignes de précipitation soit quelque peu déplacée dans le champ de diffusion et qu'elles soient moins nettes, ces lignes correspondent cependant sensiblement par leur distribution intrinsèque et leur nombre à celles observées dans le cas d'opposition du venin de *V. aspis* au sérum anti-*V. ammodytes*. Les faisceaux de lignes ainsi formés pour ces deux venins apparaissent du reste en continuité, indiquant la parenté de la nature de certains de leurs constituants antigéniques respectifs dans les présents phénomènes immunologiques.

Dans les conditions d'expérience réalisées dans l'immunogramme représenté par la figure 3, planche I, nous avons opposé au sérum anti-*V. ammodytes* introduit dans la cupule centrale, les venins des vipéridés suivants, distribués en solutions équivalentes

dans les cupules périphériques : *V. ammodytes* (Yougoslavie), *V. aspis* (France), *V. russellii* (Inde), *Bitis arietans* (Afrique australe), *Bitis gabonica* (Afrique équatoriale) et *Bothrops jararaca* (Brésil).

Les phénomènes d'interaction du sérum anti-*V. ammodytes* avec ces divers venins ont abouti à la formation de tracés linéaires caractéristiques et bien visibles sur la figure.

En ce qui concerne les phénomènes d'interaction spécifique entre le sérum anti-*V. ammodytes* et le venin homologue ainsi que le venin de *V. aspis*, on retrouve les mêmes caractères communs et différentiels observés dans les phénomènes de précipitation décrits ci-dessus.

L'opposition de ce même sérum anti-*V. ammodytes* et du venin de *V. russellii* aboutit à la formation de 5 lignes bien nettes, traduisant ainsi la présence d'un nombre correspondant de facteurs antigéniques communs à ce représentant asiatique des vipéridés et à celui de la région balkanique.

Le champ de diffusion correspondant aux venins des deux vipéridés africains montre deux tracés linéaires en continuité, indiquant la présence d'antigènes communs à ces deux venins. Le spectre de *B. gabonica* montre une ligne de précipitation supplémentaire non décelable chez *B. arietans*. Ces différences reflètent une composition antigénique plus large pour le venin de *B. gabonica*, particularité que les tests de neutralisation croisée font ressortir non moins clairement. En ce qui concerne le venin de *Bothrops jararaca*, 1 seule ligne peu marquée est décelable, fait en accord avec le degré de protection limité exercé par le sérum anti-*V. ammodytes* envers le venin de ce vipéridé brésilien.

La spécificité des phénomènes immunologiques mis en évidence par cette méthode apparaît encore avec plus de netteté lorsqu'on met en opposition un sérum anti-vipère tel que le sérum anti-*ammodytes* avec un venin de divers colubridés, respectivement de *N. flava*, *N. naja* et de *Bungarus fasciatus* ; il n'en résulte aucun phénomène visible de précipitation.

La spécificité de ces réactions immunologiques s'est confirmée par d'autres tests analogues, dans lesquels nous avons opposé les venins de divers autres élapidés, tels que *Sepeidon haemachates* et *Dendraspis angusticeps*, ainsi que de *Bungarus fasciatus* au sérum anti-*V. aspis*. Comme pour les épreuves sus-mentionnées il ne nous a pas été possible de déceler de phénomènes de précipitation dans les champs de diffusion respectifs.

Ces faits doivent être mis en rapport avec les caractères antigéniques sensiblement différents à divers égards des venins des élapidés. Le principal élément toxique de ces derniers est constitué par la neurotoxine ; cette dernière s'avère être de nature antigénique et biologique suffisamment différente des constituants

des venins des vipéridés pour ne pas déterminer avec le sérum des chevaux immunisés avec ceux-ci des phénomènes de précipitation de groupe. Ces constatations témoignent d'une spécificité antigénique marquée, différenciant les venins des deux grands groupes d'ophidiens représentés par les vipéridés et les élapidés.

VENINS D'ÉLAPIDÉS.

Utilisant la même méthode immunochimique de double diffusion en milieu gélifié selon les modalités techniques décrites plus haut, nous avons procédé à la mise en évidence des constituants antigéniques du venin de divers colubridés. Nous examinerons tout d'abord les phénomènes d'interaction résultant de l'opposition du venin de *N. naja* au sérum homologue de ce cobra asiatique, espèce-type des venins d'élapidés. Nous examinerons par ailleurs les phénomènes d'interaction résultant de l'opposition de ce même antiserum à divers venins d'autres représentants d'élapidés et de vipéridés.

La figure 4, planche I, montre les spectres de lignes résultant de l'opposition du sérum anti-*N. naja* (sérum antivenimeux C de l'Institut Pasteur de Paris) introduit dans la cupule centrale, au venin homologue de ce même cobra et de quatre autres élapidés. En ce qui concerne les interactions des deux éléments spécifiques venin-sérum anti-*N. naja*, on remarque la présence de cinq lignes principales dans le champ de diffusion correspondant, lignes qui rejoignent celles apparues indépendamment, en nombre identique dans le champ voisin correspondant à l'aire de diffusion du venin de *N. flava* africain.

Ce dernier venin, dans lequel la neurotoxine est comme dans celui de *N. naja* l'élément essentiel, se rapproche de près par ses caractères d'antigénicité et de spécificité de son parent asiatique ; cette parenté ressort également des résultats étroitement liés de protection réciproque observés dans les tests de neutralisation croisée par mélange du venin *N. flava* africain avec le sérum anti-*N. naja* asiatique, et vice et versa (Grasset, 1935 ; Mallick, 1935).

Dans ce cas encore, les caractères des faisceaux linéaires observés dans les immunogrammes respectifs paraissent venir se superposer de près aux résultats de neutralisation croisée expérimentale.

L'examen des champs de diffusion correspondant au venin de *Bungarus fasciatus* et de *Sepedon haemachates* montre des tracés de lignes de nombre plus restreint. Il est intéressant de retrouver pour ces deux derniers venins, les deux mêmes lignes présentes dans le champ de diffusion des deux venins types de *N. naja* des Indes et *N. flava* africain.

Bien que moins prononcées que pour les deux venins précités, ces lignes de précipitation se présentent en continuité, indiquant à nouveau la présence de principes antigéniques communs à ces venins et dont la neurotoxine est le constituant principal. Par ailleurs, la comparaison de ces constatations avec les épreuves de neutralisation croisée par les sérums respectifs permet de préciser et de limiter le caractère relatif de cette parenté. Dans le cas de *Sepedon haemachates*, l'action létale de ce venin est neutralisée pour une bonne part tant par le sérum anti-*N. flava* que par le sérum anti-*N. naja* (Grasset, 1935).

Dans le cas du venin de *Bungarus fasciatus*, les essais de neutralisation par le sérum anti-*N. naja* ont montré dès 1905 à Lamb que la protection obtenue n'est que partielle. En effet, en plus de la neurotoxine contenue dans ce venin et neutralisée par le sérum anti-*N. naja*, le venin de *B. fasciatus* contient un principe coagulant, absent dans le venin de *N. naja* et dont les propriétés toxiques ne sont de ce fait pas neutralisées par le sérum anti-*N. naja*. Ce sont ces constatations qui ont nécessité la préparation d'un sérum thérapeutique spécifique contre le venin de *B. fasciatus* et l'introduction de ce venin parmi les antigènes destinés à l'immunisation des chevaux producteurs de sérums antivenimeux polyvalents, préparés par différents instituts asiatiques, tel que l'Institut Haffkine et le Central Research Institute, à Kasauli, Inde.

Pour compléter cete série de tests et en vérifier la spécificité, nous avons encore recherché les phénomènes d'interaction de ce même sérum anti-*N. naja* opposé aux venins de vipéridés des divers continents, utilisés dans les épreuves présentes, soit : *V. aspis*, *V. ammodytes*, *V. russellii*, *B. arietans*, *B. jarraca*, *B. gabonica*. Pour aucun de ces venins il ne nous a été donné de constater la formation de précipités linéaires dans leur champ de diffusion envers le sérum anti-*N. naja*.

Ainsi, en confirmation des résultats obtenus par les épreuves relatées précédemment, mettant en opposition les venins de divers vipéridés et d'élapidés avec leur sérum homologue, les phénomènes d'interaction antigène-anticorps observés en gélose montrent des caractères de spécificité, se superposant aux essais de neutralisation spécifique et de groupe par mélange *in vitro* et injection de ces mélanges aux animaux de laboratoire.

Dans des travaux récents sur la constitution antigénique des venins de serpents de l'Inde, Kulkarni et Rao, de l'Institut Haffkine, utilisant la méthode d'Oudin, ont étudié les phénomènes d'interaction en milieu gélifié des venins de *N. naja*, *Bungarus fasciatus*, *V. russellii* et *Echis carinatus* avec le sérum homologue de lapins immunisés avec ces venins respectifs.

Le résumé d'un exposé présenté au I^{er} Symposium interna-

tional sur les toxines animales (Berkeley, Californie, 1954) (1) nous apprend que ces auteurs ont observé 10 lignes de précipitation pour le venin de *N. flava*, 9 pour le venin de *Bungarus fasciatus* ainsi que pour celui de *V. russellii* et 14 pour *Echis carinatus*.

Les recherches que nous avons effectuées indépendamment de ces auteurs avec le sérum antivenimeux polyvalent thérapeutique, préparé à l'Institut Haffkine contre les 4 venins susmentionnés, nous ont donné 5 lignes principales pour le venin de *N. naja*, 3 pour celui de *B. fasciatus* et 7 pour le venin de *V. russellii*. Le nombre plus restreint de lignes de précipitation que nous avons trouvé peut éventuellement être attribué au fait que la date de préparation du sérum utilisé dans ce dernier cas remontait à trois ans.

MISE EN ÉVIDENCE DES CONSTITUANTS ANTIGÉNIQUES
DE VENINS DE VIPÉRIDÉS ET D'ÉLAPIDÉS
EN OPPOSITION A UN SÉRUM ANTIVENIMEUX POLYVALENT ANTIVIPÉRIDÉS
ET ANTICOLUBRIDÉS.

Dans les immunogrammes 5 a et 5 b (pl. II) sont figurés les phénomènes d'interaction et de précipitation linéaire, produits par les anticorps d'un sérum polyvalent, obtenu de chevaux immunisés au moyen de venins de *Bitis arietans* et de *Naja flava*, et des solutions des venins homologues de ces deux représentants des vipéridés et des élapidés sud-africains.

Ce sérum concentré et purifié (globulines) préparé au South African Institute for Medical Research, à Johannesburg, est obtenu par le procédé de digestion enzymatique de Pope, appliqué avec quelques modifications aux sérums antivenimeux par Grasset et Christensen (1947). Son pouvoir neutralisant est de 14 mg de venin de *Bitis arietans*, et de 2 mg de venin de *Naja flava* par millilitre.

Après dilution au 1/5, ce sérum est introduit dans les cupules centrales et mis en présence de solutions équivalentes des venins homologues de *B. arietans* et de *N. flava*.

Ce test immunochimique fut complété par l'introduction, dans des cupules périphériques, de 17 venins hétérologues, provenant des vipéridés : *B. arietans*, *B. gabonica*, *V. russellii*, *V. aspis*, *V. ammodytes*, *A. rhodostoma*, *Lachesis okinavensis*, *L. flavoviridis*, ainsi que *Crotalus atrox*, *Crotalus terrificus*, *Bothrops jaracaca* et *Lachesis atrox*, et des élapidés *N. flava*, *N. Naja*, *Bungarus fasciatus*, *Sepedon haemachates* et *Dendraspis angusticeps*.

En raison du nombre élevé de ces venins il fut nécessaire de les

(1) Le texte de cet exposé, actuellement la seule documentation dont nous disposons, sera publié dans les *Proc. Amer. Ass. for Advanc. Sci.*

répartir en 2 immunogrammes différents 5 a et 5 b et de les distribuer dans chacun de ces derniers en 2 cycles, centrés chacun sur le sérum bivalent anti-*B. arietans-N. flava*. Il fut introduit à titre comparatif dans chacune de ces combinaisons les venins homologues de *B. arietans* et *N. flava*.

Suivant ce plan de distribution, l'opposition du venin *N. flava* et du sérum homologue est réalisée à 4 reprises, soit 2 champs par plaque. L'analyse individuelle des champs de diffusion montre pour le venin de *N. flava* un ensemble de quelque 10 lignes distinctes que l'on retrouve pareillement dans les quatre aires correspondant à ce venin. Ces lignes sont distribuées pratiquement dans toute l'étendue du champ de diffusion se trouvant entre le venin et le sérum. Un examen détaillé de ces tracés linéaires montre que certaines de ces lignes sont beaucoup plus marquées que d'autres dont le tracé est plus flou.

Ces caractères individuels de nombre et de distribution dans le champ se retrouvent sans exception dans les quatre champs de diffusion opposant le venin de *N. flava* au sérum polyvalent.

Par ailleurs, dans les cas où le venin de *N. flava* se trouve situé côte à côte avec le venin de *N. naja* d'Asie, on constate que plusieurs lignes de précipitation de *N. flava* sont en continuité directe avec celles du venin du cobra d'Asie.

Du point de vue immunologique, ces caractères de continuité des lignes indiquent une parenté ou des rapports très proches dans la constitution antigénique des venins de *N. flava* et de *N. naja*. Nos connaissances sur les caractères zoologiques proches de ces deux représentants africain et asiatique d'élapidés, de même que la similitude de l'activité neurotoxique de leur venin, enfin les effets de protection réciproque dans les épreuves de neutralisation croisée par leurs anti-sérums respectifs, sont autant de faits venant s'harmoniser avec cette similitude de caractères de précipitation *in vitro* en milieu gélifié.

La constance des caractères de ces phénomènes permet d'éliminer l'éventualité d'une coïncidence dans l'origine spécifique déterminante de ces processus immunologiques.

En ce qui concerne le venin de *Sepedon haemachates*, le champ de diffusion du venin de cet élapidé d'Afrique australe est caractérisé principalement par un faisceau composé de 3 lignes principales très nettes. Un examen attentif permet cependant de distinguer la présence de 4 autres lignes faibles et estompées. Ces constatations indiquent la présence de plusieurs constituants à caractères antigéniques communs avec le venin de *N. flava*, et dont l'élément neurotoxique est le principal. L'action paralysante du venin de cet élapidé est du reste neutralisée tant *in vitro* qu'*in vivo* par le sérum anti-*N. flava*.

Le venin d'un troisième représentant d'élapidés des mêmes territoires africains, *Dendraspis angusticeps*, donne des résultats moins aisément appréciables. En dehors d'un antigène caractérisé par une ligne principale peu marquée, que les épreuves de neutralisation croisée permettent de mettre en évidence et que l'on doit vraisemblablement mettre en rapport avec un antigène neurotoxique, il apparaît que les autres constituants de ce venin sont immunologiquement assez éloignés de ceux contenus dans celui de *N. flava*. Du point de vue zoologique, ces deux types d'élapidés appartiennent du reste à des familles bien distinctes, et diffèrent par divers caractères anatomiques et taxonomiques bien définis.

Pour terminer cette série, notons que le venin de *Bungarus fasciatus* de l'Inde, qui est situé dans l'immunogramme entre les deux derniers venins, détermine dans ces mêmes conditions la formation d'une ligne unique dont l'extrémité croise le faisceau du venin de *Sepedon haemachates*. La nature de ces faits parlerait en faveur d'un constituant antigénique distinct, différent à certains égards de ceux de *N. flava* et auquel nous avons déjà fait allusion antérieurement.

En ce qui concerne les venins de vipéridés, nous examinerons tout d'abord les phénomènes d'interaction spécifique entre le venin de *B. arietans* et ce même sérum bivalent, en particulier les anticorps homologues contenus dans ce dernier. L'opposition de ces éléments spécifiques a été réalisée dans les immunogrammes 5 a et 5 b dans les mêmes positions et avec des concentrations semblables dans les deux cas. On constate dans les deux champs de diffusion correspondants la présence de 7 lignes de précipitation, distinctes et très marquées, toutes croisant les lignes de précipité situées dans l'aire voisine et correspondant à *N. flava*, représentant l'autre élément spécifique contenu dans ce même sérum. Il apparaît nettement qu'aucune de ces lignes ne présente de continuité d'un champ de diffusion à l'autre. Elles correspondent à des anticorps spécifiques du venin de *B. arietans* et sans relation aucune avec celles relevant du venin de *N. flava*.

En revanche, la continuité des lignes de précipitation dues au venin de *B. arietans* et à celui de *B. gabonica* qui lui est juxtaposé est bien nette.

La constitution antigénique très voisine, à certains égards, de ces deux représentants de vipéridés africains sera examinée de plus près dans un immunogramme particulier (6, pl. II), illustrant d'une façon plus détaillée leur parenté et leurs points de différence mis en lumière par leur opposition respective avec leur sérum homologue.

L'opposition du même sérum anti-*B. arietans* avec les venins *V. ammodytes* et *V. aspis* détermine la formation d'un faisceau de lignes plus restreint qu'avec le venin de *B. arietans* ; celles-ci

traduisent cependant la présence dans ces venins de plusieurs constituants antigéniques communs au groupe des vipéridés africains et européens.

Les essais de neutralisation croisée entre le sérum anti-*B. arietans* et ces deux venins de vipères européennes ne permettent cependant pas d'assurer la survie des animaux injectés avec ces mélanges. Ils indiquent la présence, dans les venins de vipéridés européens, d'autres facteurs antigéniques supplémentaires, entre autres un principe coagulant, absent dans le venin de *B. arietans*, d'où l'inactivité apparente du sérum anti-*B. arietans* à leur égard.

Il est intéressant de remarquer par ailleurs, la continuité existant entre les lignes respectives de *V. aspis* et de *V. ammodytes*, reflétant la parenté antigénique des venins de ces vipères européennes.

Des phénomènes d'une nature analogue sont visibles dans le champ de diffusion du venin de *Bothrops jararaca* du Brésil, qui donne lieu à la formation de 3 lignes, dont 2 en continuité avec le faisceau de lignes de *V. ammodytes* ; cette parenté antigénique est connue depuis les travaux de Kraus (1930), qui a mis en évidence, par des épreuves de protection croisée, les relations étroites existant entre les venins de certains *Bothrops* sud-américains et des vipères européennes.

Cette série de tests se rapportant aux venins de vipéridés est complétée dans l'immunogramme 5 b, planche II, dans lequel, en regard du même sérum anti-*B. arietans*-*N. flava* et des venins homologues, sont opposés de la même façon les venins des vipéridés suivants : *V. russellii* pour lequel 4 lignes principales de précipitation sont visibles, bien que peu accusées, dans le champ

PLANCHE I.

FIG. 1. — Venin de *Vipera aspis* (V. as.), introduit en concentrations décroissantes dans des cupules équidistantes d'une cupule centrale renfermant le sérum spécifique anti-*Vipera aspis* (Se ER, Institut Pasteur, Paris).

FIG. 2. — Solutions de venin de *Vipera aspis* (V. as.) et de *Vipera ammodytes* (V. am.) opposées alternativement au sérum homologue et au sérum hétérologue de ces deux venins respectifs, soit sérum anti-*Vipera aspis* (Se ER, Institut Pasteur, Paris).

FIG. 3. — Immunogramme résultant de la mise en opposition de 5 venins de vipéridés, soit *V. ammodytes* (V. am.), *V. aspis* (V. as.), *Bitis arietans* (B. ar), *Bitis gabonica* (B. gab.), *Vipera russellii* (V. rus.), et d'un venin de crotalidé *Ancistrodon rhodostoma* (Anc. r.) au sérum anti-*Vipera ammodytes* (Se V. am.).

FIG. 4. — Immunogramme résultant de la mise en opposition de 5 venins d'élapidés, soit *Naja naja* (N. na.), *Naja flava* (N. fl.), *Dendrops angusticeps* (Dend. a.), *Bungarus fasciatus* (Bung. f.), *Sepedon haemachates* (Sep. h.), et d'un venin de crotalidé, *Crotalus terrificus* (Cr. t.) au sérum anti-*Naja naja* [Sérum C, Institut Pasteur, Paris (Se)].

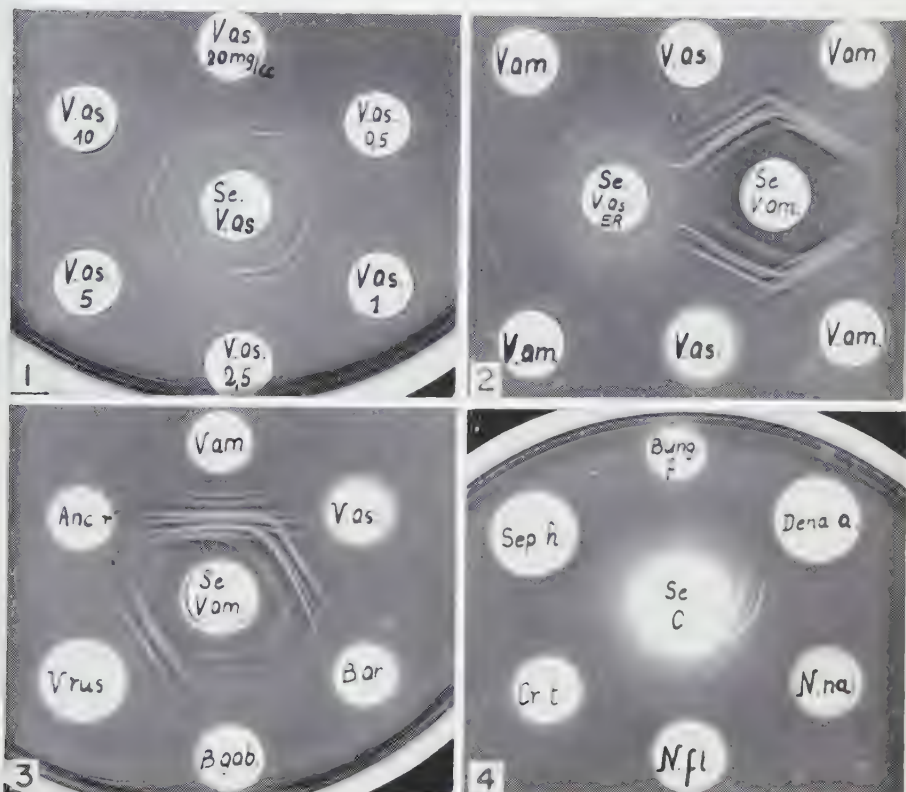


PLANCHE I.

PLANCHE II.

FIG. 5a et 5b. — Spectres de lignes de précipitation résultant de l'opposition du sérum bivalent anti-*Bitis arietans* anti-*Naja flava* (South African Institute for Medical Research, Johannesburg (Se II A. S.), aux venins de *Bitis arietans* (B. ar.), *Bitis gabonica* (B. gab.), *Vipera aspis* (V. as), *Vipera ammodytes* (V. am.), *Vipera russellii* (V. rus.), *Ancistrodon rhodostoma* (Anc. r.).

FIG. 6. — Spectres de lignes de précipitation résultant de l'opposition du sérum bivalent *Bitis arietans*-*Naja flava* (Se II A. S.) et sérum trivalent *Bitis arietans*-*Naja flava*-*Bitis gabonica* (Se III A. S.) aux venins de *Bitis arietans*, *Bitis gabonica* (B. gab.) et *Naja flava* (N. fl.).

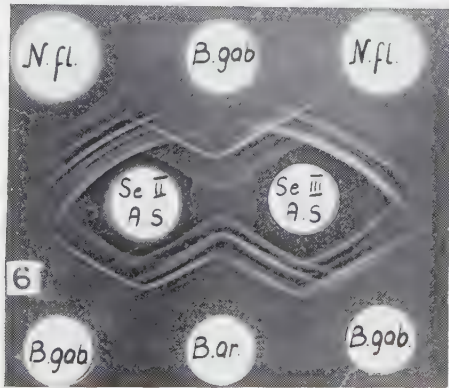


PLANCHE II.

7a



7b

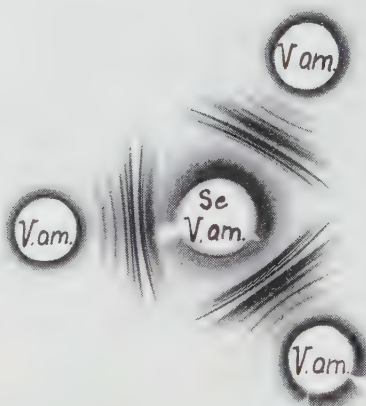


PLANCHE III.

FIG. 7a. — Micro-immunogrammes obtenus en film de gélose coulé sur lame porte-objet, dans lequel une même solution de venin de *Vipera ammodytes* (V. am.) [cupules périphériques] est opposée au sérum spécifique anti-*Vipera ammodytes* (cupule centrale) ; photographie d'une préparation fixée et colorée.

FIG. 7b. — Agrandissement de l'un des immunogrammes.

de diffusion ; *Ancistrodon rhodostoma* : une seule ligne fine est visible. Enfin, des tests similaires envers deux crotalidés sud-américains ne montrent qu'une seule ligne empâtée pour *Crotalus atrox* et *Crotalus terrificus*, tandis qu'aucune réaction de précipitation n'est apparue pour *Lachesis atrox*.

En ce qui concerne cette dernière série d'études, il apparaît donc que, dans le cas d'un sérum antivenimeux possédant des anticorps spécifiques à l'égard d'un venin de vipéridé et d'un venin d'élapidé, l'opposition dudit sérum bivalent aux deux venins homologues aboutit à la formation de deux faisceaux de lignes distinctes dont les caractères et le nombre des lignes respectives sont bien définis.

Cette épreuve permet ainsi le dénombrement des constituants antigéniques de chacun de ces venins ; en outre, ces tests, mettant en opposition des venins d'origine différente à un même sérum hétérologue, permettent de mettre en évidence la présence, dans certains des venins de vipéridés ou de colubridés, de constituants antigéniques communs ou proches, mais limités à l'un des deux groupes, vipéridés ou élapidés. Il est ainsi possible d'apprécier par ces tests de précipitation spécifique le degré relatif de parenté antigénique des venins soumis *in vitro* à ces tests.

Le haut degré de sensibilité de la méthode est mis en évidence dans le cas suivant, montrant la possibilité de distinguer deux venins caractérisés par des propriétés biologiques proches, mais dont l'un possède un composant antigénique supplémentaire.

Dans l'immunogramme 6, planche II, sont introduits, d'une part le même sérum bivalent anti-*B. arietans-N. flava*, utilisé antérieurement, et d'autre part celui de chevaux immunisés outre ces deux venins, par celui de *B. gabonica* d'Afrique équatoriale. Des épreuves de neutralisation croisée ont montré que ce dernier venin possède, en plus des constituants antigéniques communs à *B. arietans*, un facteur coagulant, qui a nécessité l'incorporation de ce venin dans la préparation du sérum destiné aux territoires africains équatoriaux (Grasset, 1936, 1940-1941).

Ce sérum trivalent est préparé également au South African Institute for Medical Research, et purifié par le même procédé enzymatique que le sérum précédent (Grasset et Christensen, 1947).

Nous avons disposé alternativement, dans cet immunogramme, en opposition au sérum bivalent anti-*B. arietans-N. flava* (à gauche) et au sérum anti-*B. arietans-N. flava-B. gabonica* (à droite), les trois venins correspondants de *B. arietans*, *B. gabonica* et *N. flava*.

L'examen des faisceaux de lignes de précipitation situés dans les champs de diffusion correspondant au sérum bivalent montre, en ce qui concerne les venins de *N. flava*, de *B. arietans* et de

B. gabonica, les mêmes caractères que ceux observés dans les immunogrammes précédents. Il en est de même des tracés correspondant au sérum trivalent pour le venin de *B. arietans* et *N. flava*. Par contre, le faisceau de précipitation correspondant au champ de diffusion de *B. gabonica* montre une ligne de précipitation supplémentaire résultant de la présence dans ce sérum trivalent de l'anticorps coagulant homologue spécifique anti-*B. gabonica*, venant se combiner avec la fraction coagulante homologue contenue dans ce venin.

Il est également intéressant de constater, dans ce même immunogramme, la continuité de certaines des lignes de précipitation entre les venins de *B. arietans* et *B. gabonica*, résultant de la présence d'antigènes communs à ces deux venins. Par contraste, on peut nettement observer le croisement du faisceau linéaire dû à *N. flava* avec celui correspondant à *B. gabonica*, témoignant de la spécificité et de l'indépendance des phénomènes d'interaction immunologique se manifestant envers les divers constituants antigéniques respectifs des venins homologues de vipéridés d'une part et d'élapidés d'autre part.

DISCUSSION.

La méthode de double diffusion en gélose, appliquée à l'étude des phénomènes immunologiques de précipitation des antigènes-anticorps venimeux *in vitro*, met en évidence la formation de phénomènes de précipitation linéaire, dont les caractères (nombre et dispositions spécifiques) correspondent aux divers constituants antigéniques des venins respectifs.

Cette méthode permet ainsi une étude qualitative et le dénombrement des divers principes antigéniques entrant dans la constitution des venins de vipéridés et de colubridés.

Les études dans lesquelles 17 venins de vipéridés et d'élapidés ont été mis en opposition en milieu gélifié avec 8 sérums anti-vipères et anti-cobras, monovalents ou polyvalents, homologues ou hétérologues, nous ont permis de confirmer la spécificité des phénomènes de précipitation linéaire apparaissant en gélose entre antigènes-anticorps venimeux.

Par l'opposition d'un venin, de l'antisérum homologue et d'un venin d'origine inconnue, il est possible, par les caractères respectifs semblables des faisceaux linéaires de précipitation, de juger soit de l'identité d'origine des deux venins, soit, par la présence éventuelle de formation linéaire dans le champ d'opposition au venin hétérologue, de mettre en évidence la présence de certains constituants antigéniques communs avec le venin homologue et d'apprécier ainsi le degré relatif de parenté antigénique entre ce dernier venin et celui du venin inconnu.

En faisant varier les concentrations de l'un ou de l'autre des deux éléments antigènes-anticorps mis en opposition, nous avons ainsi déterminé des variations dans l'emplacement, la position respective de certaines lignes dans le champ de diffusion entre un venin donné et le sérum antivenimeux homologue ; cependant, en l'état actuel de nos travaux, il apparaît peu aisé de retirer une appréciation quantitative, indicatrice des concentrations respectives des deux éléments en opposition, et permettant d'en déduire ainsi une appréciation de l'activité neutralisante des sérums antivenimeux soumis à ces tests, aspect non moins important d'une question à laquelle nous continuons à porter une attention particulière.

ETUDE COMPARÉE DES RÉSULTATS
OBTENUS PAR LA MÉTHODE DE DIFFUSION EN GÉLOSE
ET PAR L'ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE.

En ce qui concerne les venins de vipères d'Europe, nous avons étudié d'une façon particulièrement approfondie le venin de *V. aspis* par les méthodes d'électrophorèse en cuve et sur papier ; celles-ci permettent de séparer 5 fractions principales, alors que le nombre des composants antigéniques révélés par la méthode de précipitation en gélose atteint une quinzaine.

De même, pour le venin de *V. ammodytes*, le nombre des fractions mises en évidence par la méthode électrophorétique est, selon Muic et Piantanida (1954), d'au moins 7, nettement séparées en 4 groupes. Grassmann et Hannig (1954) ont également mis en évidence 7 composants. Comme nous l'avons montré plus haut, la méthode de précipitation en milieu gélifié permet de distinguer quelque 12 lignes distinctes pour ce dernier venin.

En ce qui concerne le venin de *V. russellii*, les études de fractionnement électrophorétique sur papier auxquelles nous avons soumis ce venin nous ont permis d'identifier 8 fractions distinctes, dont 5 principales (Grasset et Schwartz, 1954, 1955). Ces résultats correspondaient à ceux obtenus par Grassmann et Hannig (1954) par l'analyse de ce venin selon la méthode d'électrophorèse sur papier qui leur a permis de distinguer 7 fractions.

Il apparaît donc que, pour ce venin, le nombre des constituants antigéniques mis en évidence par la technique de diffusion en gélose est sensiblement comparable à celui trouvé par les méthodes d'électrophorèse.

Pour le venin de *Naja flava* africain, étudié par l'électrophorèse en cuve, Polson, Joubert et Haig (1946) discernent 8 composants, alors que nous trouvons un faisceau antigénique de 10 à 12 lignes (voir plus haut).

Enfin, les résultats de ces deux mêmes techniques électropho-

de lignes supplémentaires dans le faisceau linéaire des venins correspondants dans les épreuves de diffusion en milieu gélifié.

COMPORTEMENT DES ANAVENINS
DANS LES PHÉNOMÈNES IMMUNOCHIMIQUES DE PRÉCIPITATION
EN MILIEU GÉLIFIÉ.

Dans ces expériences nous avons substitué aux venins utilisés dans les études précédentes, leurs dérivés atoxiques sous forme d'anavenins. Ces derniers étaient obtenus en traitant des solutions à 1 p. 100 en eau physiologique tamponnée des venins respectifs, additionnées de 4 à 6 p. 1 000 de formaldéhyde à 39 p. 100 et soumis à une température à 37° durant un mois, selon la technique de préparation de ces antigènes utilisés pour l'immunisation des chevaux producteurs de sérums antivenimeux divers (Grasset, 1933, 1945).

L'introduction d'anavenin de *B. arietans*, en concentration correspondant à celle du venin originel, mis en opposition au sérum homologue bivalent anti-*B. arietans-N. flava*, a pour résultat l'apparition de lignes de précipitation dans la gélose de caractères semblables à ceux observés avec le venin originel, mais généralement plus floues. Des constatations similaires furent faites avec des anavenins de divers autres vipéridés tel que *V. aspis*, ainsi que d'élapidés.

La conservation du pouvoir précipitant des anavenins dans ces tests en milieu gélifié, mise en parallèle avec la production d'anticorps spécifiques chez les animaux injectés avec ces dérivés atoxiques des venins, témoignent de la conservation des propriétés antigéniques de ces derniers, comme c'est le cas pour le phénomène de floculation initiale en milieu liquide et de précipitation en milieu gélifié pour l'anatoxine diphtérique (Ramon, 1922).

Le retard de la floculation initiale dans le mélange anatoxine-sérum antidiphtérique par rapport au temps de floculation observé avec la toxine originale signalé par Ramon, se retrouve dans les phénomènes de précipitation anavenin-sérum antivenimeux homologue, dont l'apparition se manifeste plus tardivement qu'avec les venins originaux.

APPLICATIONS DE MÉTHODES MICRO-IMMUNOCHIMIQUES
POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DES CONSTITUANTS ANTIGÉNIQUES
DES VENINS.

La séparation par électrophorèse en gélose d'antigènes complexes, et leur localisation selon la technique de précipitation immunochimique mise au point par Grabar et Williams

(1953) d'une part, et l'adaptation de cette technique par Scheidegger (1955) en micro-méthode d'autre part, nous ont permis de réaliser, avec la même spécificité et la même sensibilité, les phénomènes immunologiques observés au moyen de la technique standard utilisée dans le présent travail.

Sans entrer dans les détails de ces études qui feront l'objet d'un exposé particulier, nous pouvons cependant préciser que les résultats acquis montrent que cette micro-technique est particulièrement appropriée à la mise en évidence des constituants antigéniques de divers venins par leur opposition aux immun-sérum correspondants.

La micro-technique de double diffusion en gélose possède l'avantage de nécessiter des quantités considérablement moindres de matériel (soit environ cent fois moins de venin et de sérum que la méthode classique). Des quantités de l'ordre de 0,001 mg de venin d'une part, et 0,001 ml de sérum d'autre part sont introduites au moyen de micro-pipettes dans des cupules de 1 mm de diamètre et éloignées les unes des autres de 2 à 3 mm, creusées dans une mince couche de gélose, coulée à la surface d'une lame pour examen microscopique.

Les avantages matériels et économiques de cette technique sont particulièrement appréciables pour certains venins dont les possibilités d'obtention sont limitées et onéreuses.

Dans cette micro-technique, les champs de diffusion en gélose des venins et immun-sérums sont très réduits et cette diffusion est par conséquent très rapide ; le temps nécessaire pour la formation des spectres de précipitation est réduit à quelques heures, alors qu'il est de plusieurs jours pour les mêmes solutions disposées en gélose dans des boîtes de Petri (méthode standard).

L'examen détaillé des phénomènes de précipitation dans ces micro-tests doit se faire à la loupe ou au microscope. On constate ainsi avec netteté la formation des tracés linéaires, comme le montrent les agrandissements hors-texte qui accompagnent ce travail (fig. 7).

Ces micro-tests permettent, d'autre part, la conservation du matériel d'épreuves, après dessiccation et coloration des films de gélose par divers réactifs colorants, propres aux techniques d'électrophorèse sur papier, tels que l'amido-schwarz, l'azocarmin, le bleu de bromophénol, etc.

CONCLUSIONS.

La méthode immunochimique de précipitation spécifique des complexes antigènes-anticorps en milieu gélifié, selon la technique de double diffusion d'Ouchterlony dérivée de la méthode d'Oudin, appliquée aux venins et aux sérums antivenimeux,

permet la mise en évidence, sous la forme de faisceaux de lignes de précipitation, de divers composants antigéniques des venins de vipéridés et d'élapidés.

Par l'opposition d'un venin d'origine inconnue à un sérum antivenimeux dont les caractères de précipitation envers le venin homologue sont connus, il est possible de déterminer :

1° L'identité ou la similitude de constitution des composants antigéniques de ce venin inconnu avec les constituants du venin connu.

2° La présence dans ce venin inconnu de certaines fractions antigéniques différentes de celles contenues dans le venin connu.

3° Le degré de parenté antigénique du venin inconnu par rapport au venin homologue connu.

4° L'absence de constituants antigéniques communs aux deux venins, ou l'absence d'anticorps spécifiques homologues dans un sérum ne donnant lieu à aucun phénomène de précipitation appréciable.

Les résultats fournis par ces méthodes immuno-chimiques offrent un haut degré de spécificité et de sensibilité.

Les caractères et la distribution des faisceaux de lignes de précipitation dans le champ de diffusion dépendent, en particulier, des concentrations respectives des éléments antigènes-anticorps mis en opposition dans le gel.

Les lignes de précipitation sont particulièrement fines et bien marquées, lorsque les anticorps opposés aux venins consistent en globulines, obtenues par purification des sérums antivenimeux par un procédé de digestion enzymatique tel que celui de Pope.

Pour un venin donné, les caractères de spécificité antigénique des précipités ainsi formés s'observent d'une façon aussi définie, qu'il s'agisse d'un sérum homologue monovalent, ou que les anticorps spécifiques soient contenus dans un immunsérum polyvalent.

D'une façon générale, pour un venin donné examiné vis-à-vis d'un sérum homologue, le nombre des lignes de précipités observés en milieu gélifié correspond à au moins autant d'antigènes distincts. Ce nombre est souvent supérieur au nombre de fractions révélées par l'analyse électrophorétique en cuve ou sur papier du même venin.

La mise en évidence de lignes de précipitation entre un sérum antivenimeux et un venin hétérologue permet de se faire une idée du degré relatif de protection par neutralisation de groupe que ce sérum peut offrir contre le venin étudié.

La mise au point d'une microméthode pour ces réactions immuno-chimiques (tests exécutés dans films de gélose coulés sur

lame pour examen microscopique) permet de réaliser ces mêmes épreuves avec un degré semblable de spécificité et de sensibilité.

Cette microtechnique offre des avantages économiques et pratiques particuliers du fait qu'elle nécessite des quantités de venin et de sérum antivenimeux cent fois inférieures à celles utilisées pour les tests classiques.

SUMMARY.

The authors applied Ouchterlony's double diffusion method to the study of venoms and anti-venomous sera. They were able to demonstrate the presence of series of lines of precipitation, which correspond to different antigenic constituents of *Viperidae* and *Elapidae* venoms.

By this method, the antigenic constituents of different venoms can be compared. Thus, it is possible to determine which antigenic constituents are common to several venoms and which are absent or different. One is able to appreciate the degree of relationship which may exist between these venoms.

For a given venom in the presence of an homologous serum, the number of lines of precipitation (which correspond to at least the same number of distinct antigens) is often greater than the number of fractions of the same venom which can be separated by electrophoresis.

These specific and highly sensitive immunologic methods allow the precise study of the antigenic constitution of venoms. In practice, they permit to appreciate the degree of relative protection (by group neutralisation) that a non homologous serum may exert against a venom of known constitution. A micromethod is described, which, by the use of purified antivenomous sera, gives very accurate results.

BIBLIOGRAPHIE

- ARANTES (J. B.), KARMANN (G.) et BIER (O. G.). *Mem. Inst. Butantan*, 1944-1945, **18**, 21.
BIER (O. G.). *Mem. Inst. Butantan*, 1944-1945, **18**.
CALMETTE (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1894, **118**, 720.
CALMETTE (A.) et MASSOL (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, **23**, 155.
CÉSARI (E.) et BOQUET (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **55**, 307 ; 1936, **56**, 171 ; 1937, **58**, 6.
CHRISTENSEN (P. A.). *Bull. W. H. O.*, 1953, **9**, 353.
GHOSH (B. N.) et KUNDU (N. L.). *Indian J. med. Res.*, 1940, **27**, 1121.
GRABAR (P.) et BURTIN (P.). *Presse méd.*, 1955, **63**, 804.
GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
GRASSET (E.). *Bull. trim. Org. Hyg. SDN*, 1936, V, extrait n° 5.
GRASSET (E.). *Bull. Org. Hyg. SDN*, 1940-1941, **9**, 502.

- GRASSET (E.). *Trans. Roy. Soc. trop. Med.*, 1945, **38**, 463.
- GRASSET (E.). *Document WHO/BS/316* (30 septembre 1955).
- GRASSET (E.) et CHRISTENSEN (P. A.). *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1947, **41**, 207.
- GRASSET (E.) et SCHWARTZ (D. E.). *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.*, 1954, **17**, 514.
- GRASSET (E.) et SCHWARTZ (D. E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 271.
- GRASSET (E.), ZOUTENDYK (A.) et SCHAAFSMA (A.). *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1935, **28**, 601.
- GRASSMANN (W.) et HANNIG (K.). *Z. physiol. Chem.*, 1954, **296**, 30.
- KAMINSKI (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 279.
- KRAUS (R.). *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, **3**, 1. Fischer édit., Jena, 1930.
- KULKARNI (M. E.) et RAO (S. S.). (A paraître dans *Proc. Amer. Ass. advanc. Sci.*)
- LAMB (G.). *Lancet*, 1904, **2**, 1273 ; *Calcutta*, 1905.
- LAPRESLE (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 654.
- MALLICK (S. M. K.). *Indian J. med. Res.*, 1935, **23**, 525.
- MUIG (N.) et PIANTANIDA (M.). *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1954, **298**, 9, 141.
- OUCHTERLONY (O.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1948, **25**, 187.
- ODIN (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 115 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 531.
- PHISALIX (C.) et BERTRAND (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1894, **118**, 356 ; *Arch. Physiol.*, 1894, **6**, 612.
- POLSON (A.), JOUBERT (F. J.) et HAIG (D. A.). *Biochem. J.*, 1946, **40**, 265.
- RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 661, 711 et 813.
- SCHEIDEGGER (J.-J.). *Int. Arch. Allergy*, 1955, **7**, 103.
- SCHEIDEGGER (J.-J.) et ROULET (H.). *Praxis*, 1955, **44**, 73.
- SCHOTTIER (W. H. A.). *Bull. O. M. S.*, 1955, **12**, 877.

IDENTIFICATION, FRÉQUENCE ET ANTIBIOGRAMME DES BACILLES A GRAM NÉGATIF, ISOLÉS DANS LES AFFECTIONS DES VOIES URINAIRES

par L. CARRÈRE et M^{lle} A. SUIRE (*).

(Laboratoire de Microbiologie
de la Faculté de Médecine de Montpellier)

Un travail antérieur fait au laboratoire [1] a permis de montrer la valeur pratique du milieu à l'éosine-bleu de méthylène (E. M. B.) pour la détection et l'identification rapide des bactéries des infections des voies urinaires.

Depuis lors, la technique a été utilisée quotidiennement ; en cinq ans, plus de 8 600 examens ont été effectués, qui en confirment l'intérêt clinique.

Nous donnerons plus tard une vue d'ensemble sur les résultats des examens de cinq années. Nous bornerons notre étude à 600 examens, pratiqués au cours des années 1954-1955, portant sur les prélèvements qui nous furent adressés par la clinique des voies urinaires du Centre Hospitalier Régional (professeur E. Truc).

La notion ancienne du rôle principal, si non essentiel d'*E. coli*, en dehors de *Mycobacterium tuberculosis*, dans les affections de l'arbre urinaire, a été dépassée ; actuellement, grâce aux méthodes plus précises (le test dit I. M. V. I. C. en particulier) d'autres bactéries sont fréquemment isolées ; en outre, les associations microbiennes se révèlent nombreuses. Il y a un fait de constatation récente qu'il faut souligner : les espèces *Proteus* et *Pseudomonas* augmentent de fréquence, peut-être par un phénomène de sélection dû à l'antibiothérapie, ces bactéries, on le sait, étant beaucoup plus résistantes aux antibiotiques courants.

Le bilan des infections des voies urinaires par les Entérobactériacées permet d'affirmer leur rôle essentiel et la réalité de leur origine intestinale, en dépit des critiques et des doutes portant sur le « syndrome entéro-rénal ».

D'après nos constatations, les infections urinaires sont : soit monomicrobiennes (71,7 p. 100 des cas), soit polymicrobiennes

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 avril 1956.

(28,3 p. 100 des cas) ; il peut alors s'agir de l'association de deux espèces, ou de trois ou quatre.

En établissant un ordre de fréquence, on trouve :

Escherichia coli : dans 40 p. 100 des cas.

Seul (76 p. 100), ou associé (24 p. 100 de ces cas) à entérocoque, staphylocoque, *Proteus*, *Pseudomonas*.

Proteus : dans 26 p. 100 des cas.

Seul (61 p. 100), ou associé (39 p. 100 de ces cas) à staphylocoque, entérocoque, *E. coli*, streptocoque, *Aerobacter aerogenes*, pneumocoque.

Pseudomonas : dans 22 p. 100 des cas.

Seul (52 p. 100), ou associé (48 p. 100 de ces cas) à staphylocoque, entérocoque, *E. coli*, *Aerobacter aerogenes*.

Aerobacter aerogenes : dans 10 p. 100 des cas.

Seul (60 p. 100), ou associé (40 p. 100 de ces cas) à entérocoque, staphylocoque, *Proteus*.

Enfin, dans 1,6 p. 100 des cas, on trouve des *paracoli*, et dans 0,3 p. 100 *Faecalis alcaligenes*.

Le graphique 1 permet d'objectiver ces résultats.

Une première constatation s'impose : la grande fréquence des associations, puisque, dans 32 p. 100 seulement des cas, *E. coli*, le plus souvent détecté, est seul en cause. C'est cette bactérie qui est la moins fréquemment associée, soit, en réduisant nos calculs en des fractions simples, dans 1/4 des cas ; tandis que *Proteus* et *Aerobacter aerogenes* sont associés dans 1/3 des cas. Quant à *Pseudomonas*, c'est seulement dans la moitié des cas qu'il se trouve isolé.

Une autre remarque, non moins intéressante : l'association de deux bacilles Gram négatifs est relativement rare ; le plus généralement une entérobactérie est accompagnée de cocci Gram positifs : entérocoque ou staphylocoque pathogène.

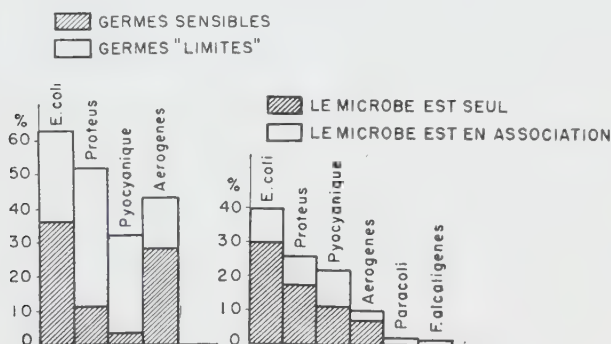
Si nous comparons des statistiques comparables, c'est-à-dire effectuées dans les mêmes conditions, nous ne pouvons que nous reporter au travail cité plus haut [1]. Il avait été isolé : *E. coli* dans 33 p. 100 des cas ; *A. aerogenes* dans 28 p. 100 des cas ; *Proteus* dans 22 p. 100 des cas ; des *paracoli* dans 11 p. 100 des cas ; *Pseudomonas* dans 4 p. 100 des cas, et *Faecalis alcaligenes* dans 2 p. 100 des cas.

On remarque l'augmentation très sensible des *Pseudomonas* : 22 p. 100 (1954-1955) contre 4 p. 100 (1951) ; augmentation nette des *Proteus* : 26 p. 100 (1954-1955) contre 22 p. 100 (1951), au détriment, semble-t-il, des *Aerobacter aerogenes* : 10 p. 100 (1954-1955) contre 28 p. 100 (1951) ; augmentation aussi des cas à *E. coli* : 40 p. 100 (1954-1955) contre 33 p. 100 (1951). D'autre part, en 1951, il n'a pas été fait état des associations microbiennes, probablement en raison de leur faible incidence.

Il ne nous appartient pas, pour l'instant, de tirer des conclusions d'ordre clinique de nos investigations bactériologiques, bien que nous puissions confirmer l'exactitude des constatations d'autres auteurs quant à la plus ou moins grande gravité des pyuries, selon la bactérie ou les bactéries en cause, en considérant que *E. coli*, trouvé à l'état pur, concerne surtout des malades peu atteints et qui guérissent assez souvent rapidement grâce à un traitement hygiéno-diétitique associé au Rufol.

Par contre, nous croyons utile de rapporter les résultats des tests aux antibiotiques qui ont été effectués sur les espèces détectées.

La technique utilisée est celle des disques de Chabbert. Les



GRAPHIQUE I.

urines sont ensemencées directement sur milieu coulé en boîte de Petri qui est placée une heure à 37° avant de recevoir les disques. Ainsi il n'y a aucun retard pour donner aux cliniciens les résultats de l'antibiogramme, avec cet avantage qu'il s'agit d'une première culture directe, du test de tous les germes présents dans le prélèvement d'urines, ce qui permet de contrôler la résistance des bactéries associées dans leur ensemble, si tel est le cas, et des unes par rapport aux autres, favorisant l'isolement des plus résistantes.

Dans ces conditions nous avons obtenu les résultats suivants de sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques et sulfamides :

E. Coli : 246 *E. coli* seuls ou associés, en pourcentage.

	PÉNICIL.	S.M.Y.	CHLORAM.	AURÉO.	TERRA.	ÉRYTHRO.	BACITR.
Germes sensibles.	0	23	36	38	46	0,4	1,2
Germes à sensibilité « limite » .	0,4	31	27	32,5	26	0,8	0,6

La sensibilité aux quatre antibiotiques : S.M.Y., Chloramphénicol, Auréomycine, Terramycine, surtout à ces deux derniers, est donc la plus fréquente.

Evidemment, les bacilles sensibles à l'Auréomycine le sont presque toujours à la Terramycine.

Nous avons pu classer les *E. coli* selon le groupe d'antibiotiques auquel ils sont sensibles (étude portant uniquement sur les souches isolées pures).

Sensibles à : Auréomycine-Terramycine : 7 p. 100.

Sensibles à : Chloramphénicol-Auréomycine-Terramycine : 30 p. 100.

Sensibles aux quatre antibiotiques : 36 p. 100.

Un groupe tout à fait séparé est celui des *E. coli* sensibles seulement à la Streptomycine : 9 p. 100.

Proteus : Nombre 159, seuls ou associés, en pourcentage :

	PÉNICIL.	S.M.Y.	CHLORAM.	AURÉO.	TERRA.	ERYTHRO.	BACITR.
Germes sensibles.	0,6	10	11	8	7	1,2	1
ou	1						
Sensibilité « limite ».	0	27	41	44	15	1,8	0

Sensibilité des *Proteus* aux sulfamides :

Adiazine	13
Rufol.	20
Septoplix.	14
Thiazomide.	19

B. Pyocyannique : Nombre 136, seuls ou associés, en pourcentage :

	PÉNICIL.	S.M.Y.	CHLORAM.	AURÉO.	TERRA.	ERYTHRO.	BACITR.
Sensibles	2	0	3	4	6	0	0
Sensibilité « limite »	0	9	29	18	20	4	3

Sensibilité des *B. pyocyaniques* aux sulfamides :

Adiazine	1,6
Rufol.	1,6
Septoplix.	10
Thiazonide.	3

Aérogènes : Nombre 66, seuls ou en association, en pourcentage :

	PÉNICIL.	S.M.Y.	CHLORAM.	AURÉO.	TERRA.	ERYTHRO.	BACITR.
Sensibles	6	14	28	32	30	4,5	0
« Limites »	0	21	45	16	15	4,5	3

Sensibilité des *Aérogènes* aux sulfamides :

Adiazine	10
Rufol.	18
Septoplix.	10
Thiazomide	15

De ce qui précède, nous pouvons déduire que :

1° *E. coli* reste le plus sensible à la thérapeutique antibiotique, *Pseudomonas* étant le plus réfractaire.

2° L'association de bacilles (il s'agit le plus souvent de l'association *E. coli* - *Proteus*) ne paraît avoir aucune incidence sur la résistance. En effet, sur neuf associations *E. coli* - *Proteus*, une seule a pu être considérée comme inaccessible à l'antibiothérapie.

3° Au cas où l'antibiogramme n'est pas pratiqué, le Chloramphénicol semble l'antibiotique le mieux indiqué.

4° Les sulfamides conservent, le Rufol en particulier, leurs indications, utilisés seuls ou en synergie avec les antibiotiques.

Nous pouvons ajouter que la Néomycine, introduite depuis peu dans la gamme des antibiogrammes, paraît être le plus actif des antibiotiques, même sur les *Pseudomonas*.

CONCLUSIONS

De l'étude de six cents souches d'Entérobactéries détectées dans diverses affections des voies urinaires, on peut conclure que *E. coli* n'est pas le seul responsable, que la fréquence des *Proteus*, *Pseudomonas*, *Aerobacter* augmente : les associations microbiennes, surtout avec des cocci (entéro- et staphylocoque) sont nombreuses.

Les antibiogrammes pratiqués sur l'ensemencement direct des urines permettent un test rapide, plus sûr ; il n'y a pas d'antibiotique de choix, le Chloramphénicol paraissant cependant le plus largement actif, en attendant que la Néomycine ait fait ses preuves. Enfin les sulfamides conservent leurs indications.

SUMMARY

The study of 600 strains of *Enterobacteriaceae* isolated from different urinary diseases shows that *E. coli* is not the only micro-organism responsible of the disease ; the frequency of *Proteus*, *Pseudomonas* and *Aerobacter* increases ; bacterial associations, particularly with cocci (Entero and Staphylococci) are frequent.

Antibiograms realised on direct urine culture provide a rapid and reliable test. There is no allround antibiotic ; however, Chloramphenicol seems to possess the largest activity. The effect of Neomycin is not yet enough known. Sulfonamides still have their indications.

BIBLIOGRAPHIE

[4] RENOUX G. et TERDJMAN A. *Presse médicale*, 1951, 59, 203.

TRANSFORMATION INTERSPÉCIFIQUE CHEZ DES BACTÉRIES DU GENRE *HEMOPHILUS* (*)

par P. SCHAEFFER (**)
avec la collaboration technique de M^{me} E. RITZ.

(Service de Physiologie microbienne.
Institut Pasteur, Paris)

Introduction.

Dans les transformations bactériennes étudiées jusqu'ici, l'ADN (acide désoxyribonucléique) transformant était extrait d'une souche donneuse dérivée, soit de la souche réceptrice elle-même (*homotransformation*), soit d'une autre souche de même espèce (*isotransformation*). Or, lorsque l'on traite des cultures compétentes d'une souche d'*Hemophilus influenzae* (*H. i.*), connue pour être transformable [1], par de l'ADN extrait d'un mutant résistant à la streptomycine d'une souche d'*H. parainfluenzæ* (*H. p.* Sm^r), on fait apparaître dans la culture traitée des bactéries *H. i.* Sm^r ; celles-ci, pratiquement absentes dans les cultures non traitées, sont trop nombreuses pour pouvoir provenir de mutations spontanées. Il s'agit donc d'un cas de transformation inter-spécifique (*hétérotransformation*) [2], puisque les règles actuelles de la systématique conduisent à classer donneur et récepteur dans des espèces distinctes.

Lorsque l'on traite simultanément deux échantillons d'une même culture compétente d'*H. i.*, l'un par un excès d'ADN d'*H. i.* Sm^r, l'autre par un excès d'ADN d'*H. p.* Sm^r, on constate que la fréquence de l'hétérotransformation est beaucoup plus faible que celle de l'homotransformation. Cette différence de fréquence entre les deux phénomènes n'est pas due au fait que l'on a arbitrairement appliqué à la réaction hétérotypique des conditions qui ne conviennent peut-être qu'à la réaction homotypique, comme le montrent les expériences décrites dans la deuxième partie de cet article.

(*) Ce travail a bénéficié d'une subvention de la Fondation S. A. Waksman, pour le développement des études microbiologiques en France.

(**) Manuscrit reçu le 6 avril 1956.

La première partie, de caractère préliminaire, met en évidence une particularité des réactions de transformation de *H. i.* : les conditions de culture nécessaires à la réaction de l'ADN avec les bactéries sont incompatibles avec celles qui permettent l'expression phénotypique du caractère acquis. La transformation n'atteindra donc son terme que si, entre les stades de fixation et d'expression, intervient un changement approprié dans les conditions de culture.

La troisième partie, enfin, étudie la transformation de *H. i.* par l'ADN de souches du type *H. i.* Sm^r (*H. p.*), qui tiennent leur résistance d'une transformation hétérospécifique.

L'ensemble des faits rapportés conduit à une hypothèse, présentée dans la discussion, d'après laquelle la fréquence maxima avec laquelle peut se faire une transformation traduit la qualité de l'appariement de l'ADN transformant avec « son homologue » dans la bactérie réceptrice, cet appariement devant d'ailleurs intéresser une longueur de chaîne nucléotidique supérieure à celle correspondant à un déterminant génétique.

I. — OBSERVATIONS SUR LA TRANSFORMATION DE *H. influenzae*

La présente étude porte sur l'introduction, au moyen d'ADN, du caractère de résistance à la streptomycine dans la souche transformable « Rd » d'Alexander et Leidy [3]. Nos premières expériences suivaient d'assez près la méthode décrite par ces auteurs.

Une culture en milieu liquide (1) est incubée *non agitée* à 37° ; lorsqu'elle atteint (après trois à quatre heures dans nos expériences) une densité optique correspondant à 2 à 5 × 10⁸ bactéries par millilitre, une prise de 0,2 ml de culture est transférée dans un tube contenant l'ADN transformant, dissous dans 1,8 ml de milieu. (*La culture se trouve donc être diluée par un facteur 10.*) Après dix à quinze minutes de contact, on ajoute 1 goutte de désoxyribonucléase (DNase). On prolonge l'incubation pendant deux heures encore et l'on étale sur gélose-chocolat à la Sm (100 µg/ml). Une autre numération, faite sur milieu sans Sm juste après l'addition de DNase, permet de calculer la fréquence de la transformation.

(1) Bactotryptone Difco, 20 g ; NaCl, 5 g pour 1 l. Le pH est ajusté à 7,5. Après autoclavage, les facteurs de croissance (coenzyme I et hématine) sont ajoutés sous forme de solutions filtrées, pour une concentration finale de 2 mg par litre.

Il peut être nécessaire de traiter la solution de peptone par du charbon animal, et même d'ajouter au milieu de la sérum-albumine (Armour, fraction V, 0,2 p. 100). La nécessité éventuelle de ces traitements dépend, pensons-nous, de la présence de traces d'acides gras apportées par le coton ou la verrerie.

Cette méthode, appliquée à des réactions d'homo- ou d'iso-transformation, nous a aisément permis de reproduire les résultats d'Alexander et Leidy. Dans le cas de l'hétérotransformation, la rareté du phénomène nous a cependant conduit à essayer de supprimer la dilution de la culture que comporte la méthode. Mais l'introduction de cette modification a un effet inattendu (tableau I) : la teneur de la culture en bactéries transformées, au lieu de se trouver multipliée par 10 par la suppression de la dilution, se trouve en fait divisée par un facteur supérieur à 100. Il devenait donc nécessaire, avant d'aborder l'étude de l'hétérotransformation, d'étudier l'effet de la dilution de la culture, et c'est à quoi est consacré ce chapitre préliminaire.

TABLEAU I. — Effet de la dilution de la culture compétente sur la fréquence de transformation.

Tube n°	Facteur de dilution de la culture	Nombre total de bactéries par ml après dilution	Nombre de bactéries transformées trouvées en fin d'expérience dans 0,10 ml de la culture diluée 10 fois	Fréquence de transformation
1	1	$3,2 \times 10^8$	10	1/320.000
2	2	$1,6 \times 10^8$	43	1/37.000
3	4	$8,0 \times 10^7$	230	1/3.500
4	10	$3,2 \times 10^7$	180	1/1.800
5	20	$1,6 \times 10^7$	198	1/810
6	66	$4,8 \times 10^6$	96	1/500
7	200	$1,6 \times 10^6$	27	1/590

Le déroulement de l'expérience est celui indiqué dans le texte. Des prises de la culture compétente variant de 2 ml (tube n° 1 à 0,01 ml (tube n° 7), sont transférées dans 7 tubes contenant déjà 0,02 ml d'une solution concentrée d'ADN et la quantité requise de milieu neuf pour qu'après addition de la culture, le volume final soit 2 ml.

En présence du phénomène mis en évidence par le tableau I, il convient d'abord de se demander s'il n'est pas dû à la variation du nombre de molécules d'ADN *par bactérie*, puisque ce nombre, dans l'expérience citée, augmente avec la dilution.

Les données du tableau II apportent à cette question une réponse négative : la correction de la dilution de la culture par une dilution équivalente de l'ADN laisse clairement subsister le phénomène.

TABLEAU II. — Etude de l'effet de la dilution d'une culture compétente sur la fréquence de transformation.

Facteur de dilution de la culture compétente	Concentration en ADN, en mpq par ml	Fréquence de transformation		
		au temps 1	au temps 2	au temps 3
1	2.000	1/200.000	1/3.400.000	0
	200	1/370.000	1/8.000.000	0
	20	1/1.200.000	1/19.000.000	0
4	2.000	1/2.100	1/15.000	1/126.000
	500	1/2.400	1/15.000	1/105.000
	200	1/3.900	1/5.500 (?)	1/146.000
	20	1/25.000	1/41.000	1/900.000
40	2.000	1/1.070	1/1.800	1/14.600
	50	1/7.750	1/4.900	1/68.000
	20	1/15.000	1/8.800	1/146.000

L'expérience représentée est en principe la même que celle dont les résultats figurent au tableau I ; mais elle est faite, pour chaque dilution de la culture, en présence de différentes concentrations en ADN. De plus (pour suivre la cinétique de la formation dans la culture d'un hypothétique inhibiteur de la transformation), elle est faite trois fois sur la même culture en croissance : une première fois lorsqu'est atteinte la densité optique correspondant à la compétence maxima (colonne « temps 1 ») ; une deuxième fois une heure plus tard, soit au début de la phase stationnaire (temps 2) ; une dernière fois enfin deux heures après la première (temps 3). Les teneurs en bactéries par millilitre étaient pour la culture non diluée de $3,7 \times 10^8$, $8,2 \times 10^8$ et $7,6 \times 10^8$ aux temps 1, 2 et 3 respectivement.

Il convient donc d'envisager deux hypothèses : ou bien l'effet observé de la dilution dans du milieu neuf s'explique par la *présence* dans les cultures compétentes d'un inhibiteur de la transformation, ou bien il s'explique par l'*absence* dans les cultures de substances nécessaires. Les expériences suivantes sont toutes en faveur de la deuxième hypothèse. Tout d'abord, si l'on fait des préparations d'« inhibiteur » sous forme de filtrats de cultures ayant dépassé le stade de compétence, leur addition à des cultures compétentes ne diminue pas la fréquence de transformation. (La présence d'un inhibiteur instable pourrait, il est vrai, conduire au même résultat.)

Un deuxième type d'expérience s'appuie sur l'observation suivante : lorsqu'une culture non agitée, en milieu dépourvu de

sucres, de la souche Rd s'arrête de croître, son titre est voisin de 8×10^8 bactéries par millilitre ; ce titre atteint 2×10^9 lorsque du glucose (0,2 p. 100) est présent et que les cultures sont agitées. En aucun cas le pH de la culture n'est notablement affecté. L'expérience consiste à répartir, dans deux tubes contenant une même quantité d'ADN transformant, deux fractions d'une même culture compétente non agitée ($5,2 \times 10^8$ bactéries par millilitre) ; lors de l'addition de DNase, dix minutes plus tard, l'un des tubes, A, reçoit du glucose et est agité dans le bain à 37° , le tube B restant non agité sans glucose. Quatre-vingt-dix minutes plus tard, lors de l'étalement en présence de streptomycine, la culture A, sur $1,2 \times 10^9$ bactéries viables par millilitre, en contient $6,0 \times 10^3$ qui sont résistantes, et la culture B $9,5 \times 10^1$ seulement sur un total de $7,6 \times 10^8$. Pour avoir permis à la culture A une croissance un peu plus poussée, grâce au glucose et à l'aération, on a donc multiplié par un facteur 40 (de $1/8 \times 10^6$ à $1/2 \times 10^5$) la fréquence de transformation, et cela sans faire intervenir de dilution. Ce résultat, comme le précédent, semble peu compatible avec l'hypothèse d'un inhibiteur de la transformation.

Une expérience d'un troisième type enfin, consiste, toutes choses étant égales, à comparer les fréquences de transformation obtenues dans deux types de cultures : les cultures du premier type, dont il a été exclusivement question jusqu'ici, sont diluées en même temps qu'elles sont mises au contact de l'ADN ; celles du deuxième type ne le sont que lors de leur mise au contact de la DNase. On voit (tableau III) qu'il n'importe pas que le contact des bactéries avec l'ADN ait lieu en milieu dilué ou non. Autrement dit, la « pénétration » (2) de l'ADN se fait normalement en milieu non dilué, et c'est l'expression phénotypique du caractère introduit qui seule requiert la dilution.

EN CONCLUSION, l'effet décrit de la dilution des cultures compétentes tient au fait que *la compétence des bactéries Rd apparaît si tardivement au cours de la croissance que le milieu, déjà presque épuisé, ne permet plus le métabolisme nécessaire à l'expression du caractère nouvellement acquis.*

Une telle conclusion n'a de sens que parce que, dans des conditions données de cultures (et contrairement à ce que l'on observe chez le pneumocoque), la compétence de la souche Rd apparaît pour un titre bactérien *indépendant de la taille de l'inoculum* [4]. Ainsi, dans nos expériences, ce titre associé à l'état de compé-

(2) Par pénétration, il faut entendre : ce qui arrive à l'ADN transformant et le rend, à partir d'un certain temps de contact avec la bactérie, inaccessible à la DNase.

TABLEAU III. — Effet de la dilution des cultures sur l'expression phénotypique des bactéries transformées.

Facteur de dilution de la culture	Contact avec l'ADN par rapport à la dilution	Fréquence de transformation
1 (pas de dilution)		1/8.000.000
4	après	1/20.000
	avant	1/12.000
16	après	1/8.000
	avant	1/5.000
100	après	1/1.500
	avant	1/1.700

Les bactéries ($5,4 \times 10^8$ par millilitre pour la culture non diluée) sont dans tous les cas laissées au contact de l'ADN pendant dix minutes, l'addition de nucléase mettant fin au contact. La culture non diluée est en présence de $2\mu\text{g}$ d'ADN par millilitre ; le rapport ADN/bactéries est maintenu constant dans toutes les cultures, quelle que soit la dilution qu'elles subissent. Un temps de quatre-vingt-dix minutes est donné pour l'expression phénotypique. Toutes les cultures sont incubées, non agitées, à 37° .

tence est resté voisin de 4×10^8 bactéries par millilitre (3), alors que les titres après inoculation variaient de 4×10^5 (expérience de la figure 1) à 2×10^7 .

La figure 1 montre également que l'effet de la dilution de la culture est notable dès le début de l'apparition de la compétence ; en d'autres termes, *à aucun moment de la croissance la transformation ne peut être menée à son terme sans l'aide d'une dilution*. Cette dernière démasque un phénomène déjà connu chez le pneumocoque [5], à savoir : l'existence d'un « pic de compétence » très aigu, existant même en l'absence de synchronisation. Ce pic, dans notre cas, correspond, sur la courbe de croissance, à un titre bactérien égal à la moitié du titre maximum final ; la compétence disparaît, parfois très brusquement, quand la culture entre en phase stationnaire.

La dissociation spontanée entre fixation irréversible de l'ADN

(3) Ce titre dépend par contre des conditions de culture : dans les cultures glucosées agitées, il est voisin de 1×10^9 . Ces conditions conviennent d'ailleurs mal au développement de la compétence, la fréquence de transformation étant inférieure à 10^{-4} .

et expression phénotypique, que nous avons montré exister chez *H. influenzae*, revêt une importance pratique évidente pour la recherche de la transformation chez des espèces bactériennes nouvelles. Il suffit pour s'en convaincre de remarquer que si l'on appliquait à la souche Rd la technique habituellement utilisée pour la transformation du pneumocoque (technique ne compor-

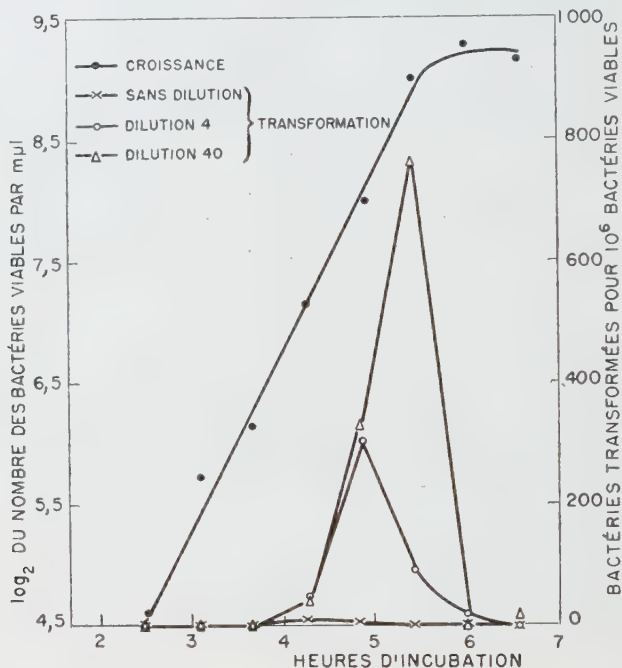


FIG. 1. — Démasquage de la compétence de la souche Rd par la dilution. Le milieu est ensemencé au temps zéro pour contenir 4×10^5 germes par millilitre et incubé non agité. Au temps deux heures vingt minutes, et dès lors toutes les trente-cinq minutes, on met trois prélèvements de la culture en présence d'ADN pendant dix minutes (l'un des prélèvements n'est pas dilué, un autre est dilué quatre fois, le troisième quarante fois). Temps d'expression uniforme de quatre-vingt-dix minutes.

tant pas de dilution), on aboutirait à la conclusion erronée que la souche Rd n'est pas, ou à peine, transformable.

II. — L'HÉTÉROTRANSFORMATION.

MISE EN ÉVIDENCE ET FRÉQUENCE DU PHÉNOMÈNE. — Pour rechercher si des transformations hétérospécifiques sont possibles, nous avons utilisé comme donneur d'ADN un mutant Sm-résistant de la

souche A61 de *H. parainfluenzae*, la souche Rd de *H. influenzae* jouant le rôle d'accepteur. Le caractère de résistance choisi présente les trois propriétés requises pour une telle recherche : apparition par mutation génique unique, extrême rareté de cette mutation et sélection facile de chaque individu bactérien résistant.

Ainsi qu'il est rapporté dans une note préliminaire, l'hétérotransformation recherchée existe, mais elle est bien plus rare que l'homotransformation correspondante [2]. La comparaison des fréquences de transformation des deux types est rendue possible par le fait que deux parties aliquotes d'une même culture compétente de Rd sont traitées simultanément et identiquement (à la source de l'ADN près). En fin de réaction cependant, la numération des bactéries transformées, qui peut se faire par étalement d'un faible volume de culture diluée à la surface d'un milieu gélosé dans l'homotransformation, requiert, dans l'hétérotransformation, un volume tel de culture (6-10 ml) qu'il faut incorporer celle-ci à la gélose, ce qui prolonge de douze heures l'incubation nécessaire à la lecture des résultats. Rappelons enfin que, dans tous les cas, une dilution au quart de la culture compétente dans du milieu neuf accompagne la mise en présence des bactéries avec l'ADN (voir tableaux I et II). L'interprétation des résultats est grandement facilitée par le fait qu'en raison de l'extrême rareté de la mutation en cause, les cultures témoins, non traitées par l'ADN, ne contiennent pratiquement jamais de mutants résistants spontanés.

L'ensemble des expériences montre que le rapport moyen du nombre des bactéries homotransformées à celui des hétérotransformées est compris entre 1 et 2×10^4 . Etant donné le petit nombre de colonies hétérotransformées comptées dans certaines expériences, nous ne considérerons pas comme aberrants les rapports de 5×10^3 et 5×10^4 parfois obtenus. Deux expériences, par contre, font exception, avec des rapports de 2×10^2 et 5×10^2 , respectivement, rapports que les erreurs de numération ne semblent pas pouvoir expliquer. Nous hésitons cependant aujourd'hui à souligner cette variabilité du rapport des bactéries transformées des deux types, comme nous l'avions fait précédemment [2]. Il semble, au contraire, commode et justifié d'admettre schématiquement que l'homotransformation se faisant avec une fréquence voisine de 10^{-3} , la fréquence de l'hétérotransformation est voisine de 10^{-7} . Ce résultat n'étant bien entendu valable que pour la paire de souches, et peut-être même pour le caractère, considérés.

ELIMINATION DES CAUSES D'ERREUR DANS LA DÉTERMINATION DE LA FRÉQUENCE DE LA TRANSFORMATION HÉTÉROSPÉCIFIQUE. — Avant

d'essayer de dégager la signification de la fréquence relativement si faible de l'hétérotransformation, il faut examiner si quelque erreur ne vient pas entacher sa mesure. Il n'est en effet pas à priori nécessaire que la méthode établie comme convenant à la mesure de l'homotransformation, et arbitrairement appliquée à l'hétérotransformation, convienne à la mesure de cette dernière. C'est ainsi que le moment optimum d'exposition à l'ADN, la concentration en ADN qui cesse d'être limitante, la vitesse de « pénétration » de l'ADN, la durée de l'expression phénotypique, et le niveau de résistance conféré, pourraient n'être pas les mêmes dans les deux types de transformation, et conduire de ce fait, dans le cas de l'hétérotransformation, à des mesures inexactes de fréquence. Nous allons, dans ce qui suit, voir qu'il n'en est rien et qu'il n'y a donc pas lieu de mettre en doute la validité des résultats rapportés dans le précédent paragraphe.

Lorsque l'on suit, en fonction du temps, la compétence d'une culture de Rd en train de croître, et ceci pour les deux types, homo- et hétérospécifiques, de transformation, on obtient des résultats tels que ceux qui figurent au tableau IV. Les résultats montrent que chaque fois que la fréquence de l'homotransformation est inférieure à 1/20 000, on n'observe plus d'hétérotransformation ; lorsque cette fréquence dépasse cette valeur, par contre, l'hétérotransformation est régulièrement décelée et l'on observe une certaine proportionnalité entre les deux phénomènes. Les conditions de la compétence sont donc les mêmes pour les deux types de transformation et la rareté observée de l'hétérotransformation ne peut provenir d'une exposition intempestive à l'ADN.

Le tableau V expose les résultats de mesures, faites en fonction de la concentration en ADN, des fréquences des deux types de transformation, les mesures étant effectuées sur des parties aliquotes d'une même culture compétente. On peut voir que quelle que soit l'origine de l'ADN transformant, la concentration saturante n'est pas supérieure à 750 $\mu\text{g/ml}$. La concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$, arbitrairement utilisée dans les expériences antérieures, convenait donc à la mesure de l'hétérotransformation. Les données du tableau V montrent, de plus, que le rapport des fréquences des deux types de transformation reste constant et voisin de la valeur 10 000, pour toutes les valeurs de la concentration en ADN.

La possibilité d'une « pénétration » plus lente d'un ADN hétérospécifique a également été éliminée : quel que soit le type de la transformation envisagée, le nombre maximum de bactéries transformées est atteint en huit minutes de contact, l'efficacité d'un contact d'une minute seulement étant environ quatre fois moindre. Les temps d'exposition à l'ADN de dix à quinze minutes

TABLEAU IV. — Unicité de l'état de compétence.

Temps et durée d'exposition à l'ADN (en minutes)	Nombre de bactéries viables par ml après addition de DNase	Nombre de bactéries résistantes par ml		Inverse de la fréquence de transformation		Rapport homo/hétéro	
		cultures non traitées	homo transformation	hétéro transformation	homo		hétéro
120 à 140	$1,3 \times 10^7$		0	0	0	0	
140 à 160	$2,2 \times 10^7$		0	0	0	0	
160 à 180	$2,8 \times 10^7$		5	0	$5,6 \times 10^6$	0	
180 à 200	$3,1 \times 10^7$		$1,8 \times 10^2$	0	$1,7 \times 10^5$	0	
200 à 220	$8,2 \times 10^7$		$2,3 \times 10^4$	2,5	$3,6 \times 10^3$	$3,3 \times 10^7$	$9,2 \times 10^3$
220 à 240	$1,3 \times 10^8$		$1,4 \times 10^5$	3,2	$9,3 \times 10^2$	$4,1 \times 10^7$	$4,4 \times 10^4$
240 à 260	$1,7 \times 10^8$		$2,0 \times 10^5$	6,7	$8,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^4$
260 à 280	$2,3 \times 10^8$		$1,75 \times 10^5$	10	$1,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^4$
280 à 300	$2,8 \times 10^8$		$1,1 \times 10^5$	8	$2,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^4$
300 à 320	$3,5 \times 10^8$		$6,4 \times 10^4$	1,6	$5,5 \times 10^3$	$2,2 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$
320 à 340	$4,2 \times 10^8$	0	$2,0 \times 10^4$	0	$2,1 \times 10^4$	0	
340 à 360	$4,0 \times 10^8$	0	$8,9 \times 10^3$	0	$4,5 \times 10^4$	0	
360 à 380	$3,7 \times 10^8$	0	$1,6 \times 10^3$	0	$2,3 \times 10^5$	0	

(*) Valeurs déduites de la courbe de croissance tracée sur les autres points.

Le milieu est ensemencé au temps zéro de façon à contenir 1×10^6 bactéries par millilitre. A partir de cent vingt minutes d'incubation (cultures non agitées) à 37°, et dès lors toutes les vingt minutes, deux tubes contenant 0,75 ml de milieu et 0,02 ml d'une solution concentrée d'ADN (de *H. i.*/Sm pour un tube, de *H.p.*/Sm pour l'autre) reçoivent chacun 0,25 ml de culture. Ils sont aussitôt réincubés ; après vingt minutes de contact avec les bactéries, l'ADN est détruit par addition de 0,05 ml de DNase et on procède à une numération, en absence de Sm, des bactéries viables. L'incubation est poursuivie pendant cent dix minutes encore avant la numération finale des bactéries résistantes.

TABLEAU V. — Transformations homo- et hétérospécifiques en fonction de la concentration en ADN.

Nombre de bactéries transformées par ml		Concentration en ADN, en $\mu\text{g/ml}$						
		7,5	22,5	75	225	750	2.250	7.500
Homo ($\times 10^{-4}$)		0,25	0,5	0,9	1,5	2,2	2,3	1,9
Hétéro		0,2	0,5	1,4	1,4	2,5	3,2	2,2

Dcs prises de 3 ml d'une culture de Rd atteignant $2,5 \times 10^8$ bactéries par millilitre, sont distribuées dans des tubes contenant 9 ml de milieu et des quantités variables de l'un des ADN. Contact des bactéries avec l'ADN, quinze minutes ; temps donné à l'expression, cent vingt minutes. Numération des bactéries transformées en gélose « chocolat » à 100 $\mu\text{g/ml}$ de Sm (volume de culture soumis à numération dans le cas de l'hétérotransformation : 10 ml)

antérieurement utilisés conviennent donc à la mesure de la fréquence dans les deux types de transformation.

Un déterminant génétique, introduit dans une bactérie appartenant à une espèce autre que celle dont il provient, pourrait éprouver quelque peine à faire exécuter ses directives métaboliques par un cytoplasme étranger. Les données du tableau VI nous apprennent qu'il n'en est rien, dans ce cas du moins, puisque la durée de l'expression phénotypique est indépendante de l'origine de l'ADN : 20 p. 100 des bactéries transformées sont exprimées en quinze minutes, 60 p. 100 en soixante-quinze minutes, 100 p. 100 en cent vingt minutes, et ceci dans les deux types de transformation. La faible fréquence observée dans le cas de l'hétérotransformation ne provient donc pas d'une exposition trop précoce à l'antibiotique.

TABLEAU VI. — Durée de l'expression phénotypique dans les deux types de transformation.

Durée donnée à l'expression en absence de Sm (en minutes)	Nombre de bactéries transformées par ml	
	Homotransformation	Hétérotransformation
45	$1,1 \times 10^4$	3,7
75	$3,7 \times 10^4$	7,7
120	$5,5 \times 10^4$	8
180	$5,8 \times 10^4$	11
240	$5,3 \times 10^4$	0
300	$5,9 \times 10^4$	0

Des prises de 5 ml d'une culture non agitée atteignant 3×10^8 bactéries par millilitre sont ajoutées dans deux tubes contenant 15 ml de milieu et 0,2 ml de la solution d'ADN (homo ou hétérospécifique). Aussitôt après l'addition de DNase, qui a lieu quinze minutes plus tard, des prises convenables des deux cultures (atteignant 10 ml dans le cas de l'hétérotransformation) sont incorporées dans du milieu gélosé dépourvu de Sm, les mélanges étant alors coulés dans des boîtes de Petri. Dès que toutes les boîtes sont prêtes, elles sont portées ensemble à 37° (temps zéro de l'expression). Aux temps indiqués, une mince couche de gélose apportant la Sm est versée sur certaines boîtes ; celles-ci, réincubées, sont examinées quarante-huit heures plus tard.

On ne sera pas sans remarquer l'apparente et subite disparition des bactéries hétérotransformées, et d'elles seules, entre trois et quatre heures. Des expériences de reconstruction ont montré qu'il s'agit là de l'effet décrit par Grigg [6], dû à l'énorme disproportion existant,

dans le cas de l'hétérotransformation, entre les nombres des bactéries transformées et non transformées. Le même effet s'observe dans l'homotransformation si, au moment de la mise en gélose, les prises de culture traitées sont additionnées d'un nombre de bactéries sensibles comparable à celui qu'apportent les cultures hétérotransformées.

Toutes les souches résistantes utilisées, qu'elles soient apparues par mutation, homo- ou hétérotransformation, poussent en quarante-huit heures sur gélose « chocolat » à 5 milligrammes de Sm par millilitre et aucune d'elles ne requiert l'antibiotique pour sa croissance. La possibilité est donc exclue d'erreurs dues à des différences entre les niveaux de résistance des diverses souches.

Enfin, comme le montre le tableau VII, nous avons mesuré, et trouvé identiques dans les deux types de transformation, les temps nécessaires au retour à la croissance exponentielle des bactéries transformées (l'intérêt de la mesure tient dans le fait que ce retour est un indice que l'ADN transformant est définitivement incorporé dans le génôme, à la reproduction duquel il participe dorénavant).

TABLEAU VII. — Retour à la croissance exponentielle des bactéries homo- et hétérotransformées.

Temps de la numération	Nombre de bactéries résistantes par ml	
	Homotransformation	Hétérotransformation
t	$2,7 \times 10^4$	2,6
t + 1 heure	$6,0 \times 10^4$	5,2
t + 2 heures	$11,4 \times 10^4$	13
t + 3 heures	$18,0 \times 10^4$	18

Une culture compétente de Rd, contenant $2,4 \times 10^8$ bactéries par millilitre, est diluée au quart d'une part dans du milieu contenant l'ADN homospécifique, d'autre part dans du milieu contenant l'ADN hétérosécifique. Après addition de DNase, quinze minutes plus tard, les deux cultures sont agitées dans le bain à 37° pendant deux heures qui doivent permettre l'expression complète de la résistance à la Sm. Chaque culture reçoit alors (temps t) son volume de milieu liquide contenant 500 µg/ml de Sm et l'agitation à 37° est reprise. Aux temps t, t + 1 heure, t + 2 heures et t + 3 heures, on procède à une numération des bactéries résistantes.

Si donc, en conclusion, la transformation hétérosécifique diffère grandement de l'homospécifique par sa fréquence, elle n'en diffère apparemment que par ce seul caractère.

III. — MARQUAGE DE L'ADN PAR LA BACTÉRIE PRODUCTRICE.

Les résultats qui viennent d'être exposés conduisent à penser que les inégales fréquences avec lesquelles les ADN Rd Sm^r et A61 Sm^r transforment la souche Rd, reflètent des différences structurales entre ces deux ADN. Il devient dès lors intéressant de se demander quel type d'ADN vont produire des bactéries hétéro-transformées Rd Sm^r [A61] (4) : l'ADN de type A61 Sm^r, qui leur a été fourni comme modèle, l'ADN de type Rd Sm^r, ou des ADN transformant Rd avec des fréquences intermédiaires ?

Une réponse au moins partielle est apportée par les données du tableau VIII. On voit que le type A61 Sm^r ne se retrouve pas parmi les six clones hétérotransformés utilisés comme donneurs d'ADN ; il semble que ces six ADN soient, au contraire, tous du type Rd Sm^r, transformant Rd avec une fréquence voisine de 10⁻³ ; mais il n'est pas exclu que l'un d'eux au moins (Rb Sm^r [A61] n° 2) transforme Rd avec une fréquence intermédiaire entre ces deux extrêmes. Enfin, le simple fait d'utiliser comme source d'ADN un clone provenant déjà d'une transformation de Rd pour le caractère « Sm » ne suffit pas, à lui seul, à modifier la fréquence, puisque les ADN des souches transformées Rd Sm^r (Rd) et Rd Sm^r (Rb) ne se distinguent pas de ceux des mutants spontanés Rd Sm^r et Rb Sm^r.

L'ADN des bactéries *H. i.* Sm^r (*H. p.*) possède, donc l'activité physiologique de l'ADN hétérospécifique recombining à l'activité transformante propre aux ADN produits par *H. i.* La marque de l'origine étrangère de l'ADN disparaît donc apparemment au cours de l'hétérotransformation ; plus exactement, une nouvelle marque d'origine lui est substituée : celle de la dernière souche bactérienne qui a produit l'ADN.

Leidy, Hahn et Alexander [7] ont étudié, sur la souche Rd, les fréquences de transformation par des ADN de différentes autres souches de *H. i.* (réactions isospécifiques). Bien que la transformation portât sur des caractères capsulaires se prêtant difficilement aux études quantitatives, ces auteurs ont pu observer que des bactéries isotransformées (SaRd) fournissent un ADN qui transforme la souche dont elles dérivent (Rd) avec une fréquence supérieure à celle obtenue avec l'ADN de souches Sa sauvages.

Nous pensons que le « marquage d'origine » ici décrit est un cas extrême, et de ce fait particulièrement convaincant, d'un phénomène général observé déjà par Leidy. Ce phénomène peut se décrire ainsi : quel que soit le degré de parenté des souches

(4) Ces bactéries, qui tiennent leur résistance à la Sm d'un *H. parainfluenzae*, sont toujours des *H. influenzae*, comme en témoigne leur besoin inchangé en hématine.

TABLEAU VIII. — Comparaison des fréquences de transformation de la souche Rd par les ADN de diverses souches.

Souche donneuse d'ADN	Inverse de la fréquence de transformation (Nombre de bactéries parmi lesquelles se trouve une bactérie transformée)		
	Expérience I	Expérience II	Expérience III
Rd Sm ^r	13.000	3.000	500
Rb Sm ^r	6.000	2.000	430
A61 Sm ^r	7×10^7	$4,2 \times 10^7$	
Rd Sm ^r (A61) n° 1	12.000		880
- n° 2	6.000	1.600	540
Rb Sm ^r (A61) n° 1	18.000		
- n° 2	48.000		2.200
- n° 3	18.000		
- n° 4	11.000	1.600	620
Rd Sm ^r (Rd)		1.700	400
Rd Sm ^r (Rb)		2.500	740

Les trois expériences rapportées se sont déroulées de façon identique, à ceci près, que dans les expériences I et II, le facteur de dilution de la culture compétente dans le milieu contenant l'ADN était de 4, alors qu'il était de 40 dans l'expérience III. (De cette différence de traitement résulte la fréquence plus grande de transformation de cette dernière expérience : Cf. 1^{re} partie). Les ADN utilisés n'étaient pas tous dosés, mais ils étaient ajoutés en excès si considérable que les légères différences de concentration entre les préparations devaient rester sans effet. Les différentes transformations d'une même expérience sont faites simultanément sur des parties aliquotes d'une même culture ; les fréquences indiquées ne sont directement comparables entre elles que dans une même expérience, le nombre des bactéries compétentes dans la culture n'étant pas le même d'une expérience à l'autre.

Les souches Rb et Rd sont des *H. influenzae* ; A61 est un *H. parainfluenzae* ; Rb Sm^r, Rd Sm^r et A61 Sm^r désignent des mutants résistants spontanés ; une désignation telle que Rd Sm^r (A61) n° 1 signifie : clone n° 1 résultant de la transformation hétérospécifique de Rd par l'ADN de A61 Sm^r ; de même, Rd Sm^r (Rd) désigne un clone résultant de l'homotransformation de Rd par l'ADN de Rd Sm^r.

donneuse et réceptrice, et donc la fréquence de transformation, du moment que celle-ci est possible, elle élève l'activité transformante de l'ADN à un niveau proche du maximum. Une hypothèse sur le mécanisme du phénomène est présentée dans ce qui suit.

Discussion.

La transformation de *H. influenzae* par l'ADN d'un mutant de *H. parainfluenzae* a été décrite comme *hétérospécifique*. L'un des critères importants dans la définition de l'espèce est la possibilité de croisements fertiles. Pris à la lettre, ce critère n'est d'aucun secours dans la définition des espèces du genre *Hemophilus*, mais si l'on admet que le fait essentiel d'un croisement fertile consiste dans la création d'un organisme dont le génome participe des génomes de deux organismes procréateurs, on peut tenter de faire jouer à la possibilité de transformation, en systématique bactérienne, le rôle que joue la fertilité des croisements dans la définition de l'espèce animale ou végétale. Cette attitude revient ici à mettre en doute la validité de la reconnaissance de *H. i.* et *H. p.* comme espèces distinctes. Sans prendre position, nous nous contenterons de souligner quelques caractères par lesquels diffèrent les souches Rd et A61.

SOUCHES	BESOIN en hématine	PRODUCTION D'ACIDES (ROUGE DE PHÉNOL) par incubation en présence de				
		glucose	xylose	saccharose	maltose	lévulose
<i>H. i.</i> Rd	+	±	±	0	0	0
<i>H. p.</i> A61	0	++	0	++	++	++

On voit que les caractères différentiels entre les deux souches ne se limitent nullement à la différence dans le pouvoir de synthèse de l'hématine qui est la seule différence sur laquelle repose la distinction entre les deux espèces. La barrière établie entre celles-ci tomberait sans discussion possible si l'on pouvait introduire dans *H. i.*, au moyen de l'ADN de *H. p.*, la faculté de synthétiser l'hématine. Nous n'avons à ce sujet que deux expériences négatives et de ce fait non concluantes (5). La possibilité de cette transformation (fût-elle en plusieurs étapes), n'étant pas démontrée, nous continuerons de parler de transformation hétérospécifique. Cette expression a cependant le défaut de supposer bien définies les espèces bactériennes, alors qu'il est notoire que

(5) En raison de l'existence possible de blocages multiples dans la biosynthèse de l'hématine chez *H. i.*, le milieu sans hématine, qui devait permettre la sélection des bactéries transformées He+, avait été additionné soit d'acide δ -amino-lévulinique, soit de porphobilinogène, corps que nous devons à la générosité du Dr S. Granick, du Rockefeller Institute, New York.

la systématique bactérienne actuelle ne représente qu'une classification empirique, justifiée par la nécessité pratique du diagnostic bactériologique, mais dépourvue de moyens pour apprécier la séparation génétique entre « espèces ». Dans quelle mesure l'étude de la transformation peut-elle aider à définir la notion d'espèce bactérienne, est une question que nous discuterons dans un prochain article, consacré à l'étude de l'inhibition spécifique de la transformation.

★
★★

Homo- et hétérotransformation différant, nous l'avons vu, par leur fréquence, nous devons envisager les raisons possibles d'une telle différence.

Le fait que la probabilité de l'hétérotransformation soit assez voisine du carré de celle de l'homotransformation peut suggérer qu'elle puisse être en réalité une transformation double, pour deux facteurs indépendants. Selon cette hypothèse, cependant, la transformation de Rd par l'ADN de Rd Sm^r (A61) serait aussi une transformation double, dont la fréquence devrait être de l'ordre de 10⁻⁷ ; les résultats étant, nous l'avons vu, contraires à cette prédiction, l'hypothèse doit être rejetée.

Une autre hypothèse consisterait à supposer que, étroitement lié au déterminant « Sm », se trouverait, dans l'ADN de *H. p.*, un déterminant létal pour *H. i.*, de sorte que nous n'observerions, comme bactéries hétérotransformées, que celles, rares, chez lesquelles le déterminant létal n'aurait pas été introduit. Bien qu'impossible à éliminer, cette hypothèse a l'inconvénient d'admettre, contrairement à la majorité des faits connus, qu'une transformation pour deux facteurs est la règle et celle pour un seul l'exception. De plus, pour rendre compte des résultats d'Alexander et Leidy [8] mentionnés ci-dessous, faudrait-il encore que l'ADN de *H. i.* ait, lui aussi, lié au gène « Sm », un gène létal pour *H. p.* C'est là, semble-t-il, trop demander.

Plus raisonnable semble être la possibilité que les fréquences mesurées soient caractéristiques non des ADN eux-mêmes, mais seulement des extraits que nous avons préparés ; il est, en effet, concevable qu'un même mode d'extraction et de purification de l'ADN puisse convenir à *H. i.*, mais livrer, appliqué à *H. p.*, des préparations partiellement inactivées, ou souillées par un inhibiteur de la transformation. Pour écarter cette possibilité, il faut pouvoir utiliser *H. p.* comme souche réceptrice et établir que c'est alors l'ADN de *H. p.* Sm^r qui possède la plus grande activité transformante. En dépit de nos efforts, cependant, nous n'avons pu transformer — quelle qu'ait été l'origine de l'ADN transformant — aucune des deux souches de *H. p.* (dont A61) que nous

avons utilisées. D'autres auteurs, cependant, ont été plus heureux que nous ; alors que ce travail était en cours de rédaction, nous avons appris qu'Alexander et Leidy avaient indépendamment observé la transformation hétérospécifique chez des hémophiles et possédaient au moins une souche transformable de *H. p.* [8]. Ces auteurs ont donc pu fournir la démonstration qui nous manquait. En établissant que, quelle que soit l'espèce, *H. i.* ou *H. p.*, de la souche réceptrice, c'est toujours la transformation homospécifique qui possède la fréquence la plus élevée, ils nous permettent de considérer comme hautement probable que, dans notre cas, l'intégrité des préparations de A61 Sm^r n'est pas en cause. Cette dernière possibilité semblant écartée, *rien ne s'oppose plus à ce que nous considérions comme dues à des différences structurales spécifiques des ADN les différences que révèlent leurs activités transformantes.*

★ ★

Le mécanisme de la transformation bactérienne est obscur. On ignore, à l'heure actuelle, s'il s'agit d'une incorporation matérielle de l'ADN transformant dans le matériel génétique de la bactérie réceptrice, ou dans la copie que celle-ci en fait avant division : mais il peut s'agir également d'une erreur intervenant lors de la duplication des déterminants, et consistant à synthétiser certains d'entre eux sur le modèle introduit par l'ADN transformant. On ignore, surtout, si le processus de duplication nécessite ou non l'intervention de structures accessoires, protéiques ou autres (voir la discussion d'Ephrussi-Taylor dans [9]). Ce qui nous suffit ici, cependant, c'est que l'on n'échappe pas, quelle que soit la représentation adoptée, à la nécessité d'un appariement préalable de l'ADN transformant avec une structure bactérienne homologue, celle-ci pouvant être l'ADN de la bactérie réceptrice, ou la structure accessoire mentionnée ci-dessus. Il semble donc raisonnable de supposer que *de cet appariement dépend* la probabilité du crossing-over, ou celle de l'erreur de copie, c'est-à-dire en définitive *la fréquence de la transformation.*

Il nous faut maintenant faire une digression concernant les rapports de l'unité physiologique d'ADN — la seule dont nous sachions reconnaître la présence — avec l'unité d'ADN telle qu'elle est présente dans les extraits.

La multiplicité des caractères qu'un ADN bactérien purifié est capable de transmettre et l'absence générale de liaison entre ces caractères lors de cette transmission ont longtemps conduit à se représenter une préparation d'ADN transformant comme un mélange de nombreuses molécules spécifiques indépendantes, chacune présumée porteuse d'un caractère, et d'un seul. La découverte de la transformation liée de deux caractères sans parenté

physiologique concevable (Hotchkiss et Marmur [40]) jeta le premier soupçon sur la validité de cette conception. Puis vinrent des essais de séparation de ces molécules supposées indépendantes qui, sans rester totalement infructueux, jetèrent cependant des doutes sur la possibilité d'une telle séparation (Brown et Ephrussi-Taylor, cités dans [9]; Lerman [41]). Enfin, la découverte que le « poids moléculaire radiosensible » d'un agent transformant ne représente vraisemblablement qu'une fraction du poids moléculaire de l'ADN présent en solution [12] vint renforcer l'hypothèse d'après laquelle l'unité physiologique d'ADN ne représente qu'un segment d'une chaîne polynucléotidique plus longue présente dans les extraits. Il semble que ce soit dans le cadre de cette hypothèse [9] que les faits présentés ici s'interprètent le plus aisément.

Si l'unité physiologique responsable de la résistance, qui seule a été modifiée par mutation et que nous appellerons segment « Sm », est apportée par l'ADN d'une souche *H. i.* Sm^r, ou mieux encore par celui de Rd Sm^r, les segments « non Sm » de la molécule d'ADN exogène sont identiques à leurs homologues bactériens de la souche réceptrice Rd. Ils n'apportent donc pas d'obstacle à l'appariement, et la fréquence de transformation est élevée (iso-, ou mieux encore homotransformation). Si, au contraire, le segment « Sm » est introduit dans l'ADN d'une espèce différente, les segments « non Sm » pourront avoir une structure, ou un arrangement, très différents de ceux de leurs homologues bactériens, et feront donc obstacle à un bon appariement; une basse fréquence de transformation en résultera, caractéristique de l'hétérotransformation. Dans les rares cas cependant où cette improbable transformation s'est faite, les obstacles représentés par les segments « non Sm » se trouvent exclus en majorité ou en totalité, comme en témoigne l'existence du « marquage d'origine ». Cette interprétation des faits présentés comporte que tout traitement ayant pour effet de scinder la molécule d'ADN en quelques gros polynucléotides devrait tendre, en éliminant des obstacles à l'appariement, à élever la fréquence *relative* de l'hétérotransformation. C'est dans cette direction que le présent travail se poursuit.

*
* *

Nous exprimons nos remerciements à Madame Ephrussi-Taylor et à Monsieur Thomas qui nous ont communiqué le manuscrit de leur travail, et notre gratitude à Mesdames Alexander et Leidy qui ont mis leurs souches à notre disposition et nous ont fait part de résultats inédits.

RÉSUMÉ.

1° Le titre bactérien auquel l'état de compétence d'une culture d'*Hemophilus influenzae* (souche Rd d'Alexander) apparaît régulièrement, est proche du titre maximum compatible avec les conditions de culture ; la compétence apparaît donc dans un milieu presque épuisé. Un tel milieu convient à la fixation irréversible de l'ADN transformant par les bactéries compétentes, mais il ne permet plus l'expression phénotypique, qui ne deviendra possible que lorsque des conditions compatibles avec la croissance seront restaurées. Les rapports de cette observation avec le problème de la recherche de la transformation chez d'autres espèces bactériennes sont signalés.

2° La souche Rd sensible peut recevoir la résistance à la streptomycine de l'ADN du mutant résistant d'une souche (A61) de *H. parainfluenzae*. Cette transformation hétérospécifique est environ dix mille fois moins fréquente que la transformation homospécifique effectuée par l'ADN du mutant Rd Sm^r.

3° Les transformations homo- et hétérospécifiques ne diffèrent apparemment que par leur fréquence.

4° L'ADN d'un clone résistant résultant d'une hétérotransformation transforme la souche sensible dont ce clone dérive avec la haute fréquence caractéristique de l'homotransformation. La fréquence de transformation est donc déterminée par la parenté existant entre la souche réceptrice et la dernière souche qui a produit l'ADN et lui a, ce faisant, imprimé sa marque d'origine.

5° L'interprétation des faits relatifs à l'hétérotransformation conduit à se représenter un agent transformant pour un caractère donné, non comme une molécule d'ADN indépendante, mais comme un segment spécifique dans une chaîne nucléotidique plus longue. La marque d'origine intéresserait les segments adjacents, « non spécifiques », de la chaîne, segments dont dépendrait principalement la fréquence de transformation.

SUMMARY.

1° The bacterial titre at which, under given cultural conditions, the state of competence regularly appears in growing cultures of *H. influenzae* (Alexander's Rd strain), is close to the maximal titre of the fully grown culture ; the competence therefore appears in an almost exhausted medium. As a consequence, the cells which have irreversibly bound the transforming DNA will not express the newly acquired character in their phenotype unless good conditions for growth are restored. This observation has a possible bearing upon the search for transformation among reputedly non transformable or untried species.

2° The sensitive Rd strain can be transformed to streptomycin resistance by DNA from a resistant mutant of a strain (A61) of *H. parainfluenzae*. The frequency of this heterospecific transformation is *ca* 10,000 times lower than that of the homospecific transformation induced by DNA from the mutant strain Rd Sm^r.

3° Except for this difference in their frequencies, homo- and heterotransformation reactions are indistinguishable.

4° DNA from a clone made resistant by heterotransformation will transform the sensitive strain, from which this clone was derived, with the high frequency characteristic of homospecific transformation. Thus the frequency of transformation is determined by the kinship of the recipient strain to the last strain that produced the DNA and in so doing imprinted on it its stamp of origin.

5° The interpretation of the facts pertaining to heterotransformation leads one to think of a transforming agent for a given character, not as an independent molecule of DNA, but rather as a specific segment in a longer nucleotide chain. The stamp of origin would involve the adjacent, « non-specific » segments of the chain, upon which the frequency of transformation would chiefly depend.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALEXANDER (H. E.) et LEIDY (G.). *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 345.
- [2] SCHAEFFER (P.) et RITZ (E.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 1491.
- [3] ALEXANDER (H. E.) et LEIDY (G.). *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 17.
- [4] ALEXANDER (H. E.), LEIDY (G.) et HAHN (E.). *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 505.
- [5] THOMAS (R.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **18**, 467.
- [6] GRIGG (G. W.). *Nature*, 1952, **169**, 98.
- [7] LEIDY (G.), HAHN (E.) et ALEXANDER (H. E.). *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 467.
- [8] LEIDY (G.). Communication verbale.
- [9] EPHRUSSI-TAYLOR (H.). *Adv. Virus Res.*, 1955, **3**, 275.
- [10] HOTCHKISS (R. D.) et MARMUR (J.). *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1954, **40**, 55.
- [11] LERMAN (L. S.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **18**, 132.
- [12] EPHRUSSI-TAYLOR (H.) et LATARJET (R.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 183.

CONTENU EN BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES DES BACTÉRIES

par KI YONG LEE, R. WAHL et E. BARBU (*).

(*Institut Pasteur, Paris*)

De nombreux travaux [1 à 12] ont montré que les acides désoxyribonucléiques (ADN) extraits à partir de divers organismes diffèrent dans leur contenu en bases puriques et pyrimidiques.

Pour les bactéries nous possédions un trop petit nombre d'analyses pour permettre de rechercher des relations entre la structure chimique de l'ADN et d'autres propriétés de la cellule. Nous apportons ici les résultats d'analyses des ADN provenant de 60 souches bactériennes différentes appartenant aux espèces les plus variées.

Matériel et méthodes.

Les souches bactériennes nous ont été en partie fournies par la Collection de l'Institut Pasteur, en partie par divers services de l'Institut Pasteur (1).

Chaque germe a été cultivé dans son milieu approprié à la température optimum pour lui.

Les culots bactériens ont été traités puis extraits comme dans la méthode de Smith et Wyatt [5].

A 1 g de poudre de bactéries sèches nous ajoutons 10 ml de soude normale et laissons le tout séjourner à 37° C pendant vingt heures. Après centrifugation et lavages du résidu, nous dosons l'ADN non extrait par la soude (resté dans le résidu) selon la méthode de Schneider [13] : extraction à chaud de l'ADN par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 et dosage par la méthode de Dische [14]. Nous effectuons, par la même méthode, un dosage sur une partie de la poudre bactérienne pour connaître la quantité totale d'ADN contenue dans notre préparation. Le tableau I résume ces résultats. Nous constatons qu'une partie des ADN n'est pas extraite par la soude et se retrouve dans le résidu. La proportion d'ADN extrait varie beaucoup suivant les germes traités. Pour les germes dont l'extraction est inférieure à 80 p. 100

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 avril 1956.

(1) Nous en remercions bien vivement MM. Prévot, Thibault, Pochon, Toumanoff, Le Minor, Manigault, Cassagne et Moureau.

par le procédé précédent, on peut augmenter considérablement la quantité d'ADN extraite en détruisant les parois microbiennes avant l'extraction par la soude. Nous utilisons le broyage avec la poudre de quartz dans un mortier ou avec de très petites billes de verre (ballotini) dans un appareil à agitation très rapide, comme celui de Mickle. Dans les cas de *M. lysodeikticus*, de *Sarcina lutea*, de *B. megaterium* et de *B. subtilis*, nous avons utilisé le lysozyme.

TABLEAU I.

Microorganismes	mg. A.D.N. par g. bactérie	A.D.N. pour 100 : extrait par la : soude.	Gram
<i>Sarcina lutea</i>	9,5	0	+
<i>M. lysodeikticus</i>	8,64	15	+
<i>B. cereus alesti</i>	7,1	24	+
<i>Corynebacterium parvum</i>	15,3	28	+
<i>Strep. faecalis</i>	19,0	33	+
<i>B. megatherium</i>	7,2	34	+
<i>Strep. faetidus</i>	10,3	35	+
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ..	9,0	39	+
<i>Clostridium valerianicum</i>	5,8	40	+
<i>B. subtilis</i>	7,3	41	+
<i>Ramibacterium ramosum</i>	15,4	47	+
<i>Welchia perfringens</i> (Fred) ..	7,64	52	+
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	8,7	53	+
<i>Fusiformis polymorphus</i>	13,2	54	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>	11,9	73	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20,8	77	-
<i>Pseudo. aeruginosa</i> 22 W	20,6	78	-
<i>Ristella</i> Ni 12	14,9	80	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	15,0	82	-
<i>Staphylococcus pyog. aureus</i> ..	15,3	82	+
<i>Vibrio cholerae</i>	13,6	83	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...	20,0	88	-
<i>Ristella clostridiformis</i>	10,5	88	-
<i>Fusiformis fusiformis</i>	10,9	92	-

Les ADN extraits sont précipités par l'alcool, débarrassés de protéines par la méthode de Sevag [15], puis hydrolysés à 175° C dans l'acide formique concentré.

Les bases puriques et pyrimidiques sont séparées par chromatographie sur papier Watman n° 1, en utilisant comme solvant le mélange : 68 ml d'alcool isopropylique, 17 ml d'acide chlorhydrique, densité 1,19 et 15 ml d'eau [6].

Les bases séparées par chromatographie sont éluées dans l'acide

chlorhydrique N/10 et leur quantité est déterminée au spectrophotomètre par leur absorption spécifique aux longueurs d'ondes indiquées par Chargaff et coll. [16].

Résultats.

Afin de donner toute leur signification aux résultats des analyses, il est nécessaire de préciser au préalable deux données du problème :

I. Le contenu en bases puriques et pyrimidiques des ADN d'une bactérie ne semble pas dépendre du milieu de culture, de l'âge de la culture ou de la température. Des constatations dans ce sens ont été faites par Smith et Wyatt [5] pour *E. coli* et par Reddi [17] pour *Pseudomonas hydrophila*. Nous l'avons vérifié pour *Salmonella enteritidis*, *Sarcina lutea* et *Streptococcus pyogenes*.

II. On trouve toujours dans les ADN d'une même bactérie les mêmes proportions de bases puriques et pyrimidiques, que l'extraction par la soude ait été complète ou non. L'extraction par la soude ne sépare donc pas de fractions différant entre elles par leur contenu en bases.

Par exemple, pour *Sarcina lutea* et *M. lysodeikticus*, en utilisant le lysozyme, nous avons pu obtenir la totalité des ADN tandis que, dans le cas d'un broyage mécanique, la soude n'a extrait que 30 p. 100 des ADN. Les analyses des bases des ADN ont donné dans les deux cas des résultats identiques. Des résultats comparables ont été obtenus par Chargaff et coll. [18] pour la levure et par Sherratt et Thomas [19] pour *Streptococcus faecalis*.

TABLEAU II.

Matériel	: Adénine :	Thymine :	Guanine :	Cytosine :	$\frac{A + T}{G + C}$:	Gram
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	: 25,3 :	25,1 :	25,2 :	24,4 :	1,01 :	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	: 24,6 :	24,9 :	25,5 :	25,0 :	1,00 :	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	: 24,6 :	25,2 :	25,4 :	24,8 :	0,99 :	-
" <i>enteritidis</i>	: 24,9 :	25,1 :	25,0 :	25,0 :	1,00 :	-
" <i>enteritidis</i> résistante au phage D ₄	: 24,4 :	25,7 :	24,7 :	25,2 :	1,00 :	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	: 24,8 :	25,3 :	24,9 :	25,0 :	1,00 :	-
" <i>gallinarum</i>	: 24,8 :	25,0 :	26,1 :	24,1 :	0,99 :	-
<i>Shigella paradysenteriae</i> Flexner Y ₆ R ₀	: 24,9 :	25,8 :	24,8 :	24,5 :	1,02 :	-
<i>Shigella paradysenteriae</i> Flexner Y ₆ R ₄	: 25,8 :	25,0 :	25,3 :	23,9 :	1,03 :	-
	: :	:	:	:	:	:

Les résultats des analyses des bases puriques et pyrimidiques sont résumés dans les tableaux II, III, IV et V. Les chiffres

TABLEAU III.

Matériel	Adénine	Thymine	Guanine	Cytosine	$\frac{A+T}{G+C}$	Gram
<i>Micrococcus pyog.</i> Oxf.	34,1	32,2	15,0	15,7	2,26	+
" <i>pyog.</i> 1161	35,7	33,4	16,0	14,9	2,26	+
" " 1149	34,2	34,6	16,1	15,1	2,20	+
" " 145	34,4	34,2	16,2	15,2	2,18	+
" " m 320	34,2	33,8	15,6	16,4	2,13	+
<i>Strep. pyog.</i> (gr. A)	33,4	33,0	16,6	17,0	1,97	+
<i>Strep. zymogenes</i> (gr. D)	33,1	33,3	16,2	17,4	1,97	+
<i>Strep. faecalis</i> (gr. D)	33,4	32,0	16,9	17,7	1,89	+
<i>B. cereus</i> alesti	33,5	33,2	17,3	16,0	2,00	+
<i>B. cereus</i> A ₂₅	32,3	33,2	17,9	16,6	1,90	+
<i>B. cer.</i> alesti (mutant) (31 ^e passage soude)	31,9	32,4	18,0	17,7	1,80	+
<i>B. cer.</i> alesti (mutant)	32,0	31,7	17,6	18,7	1,75	+
<i>B. thuringiensis</i> amer.	32,2	31,9	18,1	17,8	1,78	+
<i>Pasteurella aviseptica</i>	32,0	31,7	18,2	18,1	1,75	-
<i>Pasteurella bovisseptica</i>	31,0	31,4	18,8	18,8	1,66	-
<i>Proteus vulgaris</i>	32,0	31,5	18,6	17,9	1,74	-
<i>B. megatherium</i>	31,8	30,6	19,1	18,5	1,66	+
<i>B. subtilis</i>	28,9	28,7	21,0	21,4	1,36	+
<i>Vibrio cholerae</i>	28,8	27,9	20,0	23,3	1,31	-

représentent le nombre de molécules de chaque base pour 100 molécules de bases totales. Les germes sont classés dans l'ordre décroissant des rapports $\frac{A+T}{G+C}$; les tableaux II à IV concernent les germes aérobies. Le tableau V comprend les anaérobies. Les résultats représentent la moyenne d'au moins trois analyses. La reproductibilité des valeurs des pourcentages pour une même préparation d'acide nucléique est obtenue à $\pm 1,5$ p. 100, ce qui entraîne une erreur de ± 3 p. 100 sur les valeurs des rapports $\frac{A}{T}$, $\frac{G}{C}$, $\frac{Pu}{Py}$ et $\frac{A+T}{G+C}$.

L'examen des tableaux montre d'une part (A) que les trois rapports $\frac{A}{T}$, $\frac{G}{C}$ et $\frac{Pu}{Py}$ sont constamment égaux à 1, d'autre part

TABLEAU IV.

Matériel	Adénine	Thymine	Guanine	Cytosine	$\frac{A + T}{G + C}$	Gram
<i>M. Lysodeikticus</i>	14,4	13,7	37,3	34,6	0,39	+
<i>Sarcina flava</i>	15,6	15,8	33,5	35,1	0,46	+
<i>Sarcina lutea</i>	18,7	17,4	32,4	31,5	0,56	+
<i>Pseudomonas tabaci</i>	16,2	16,4	33,7	33,7	0,48	-
" <i>aerugin. S I</i>	17,0	16,9	34,2	31,9	0,51	-
" " <i>9 W</i>	17,5	17,8	34,1	30,6	0,55	-
" " <i>A 22</i>	18,0	18,0	33,1	30,9	0,56	-
" " <i>22 W</i>	17,8	17,8	33,1	31,3	0,56	-
" <i>fluorescens</i>	18,2	18,8	33,0	30,0	0,59	-
<i>Agrobact. tumefaciens</i> (non tumorigène)	21,2	20,1	30,6	28,1	0,70	-
<i>Agrobact. tumefaciens</i>	21,7	20,1	30,2	28,0	0,72	-
<i>Serratia marcescens</i>	21,1	20,9	29,0	29,0	0,72	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>	20,5	22,4	29,3	27,8	0,75	-
<i>Corynebact. diphtheriae</i>	24,2	23,9	24,8	27,1	0,92	+

TABLEAU V.

Matériel	Adénine	Thymine	Guanine	Cytosine	$\frac{A + T}{G + C}$	Gram
<i>Welchia perfring.</i> (Fred)	36,9	36,3	14,0	12,8	2,7	+
<i>Ramibacterium ramosum</i>	35,1	34,8	14,9	15,2	2,32	+
<i>Plectridium saprogenes</i>	34,7	35,0	16,0	14,3	2,30	+
<i>Ristella clostridiform.</i>	34,4	34,4	15,8	15,4	2,20	-
<i>Fusiformis fusiformis</i>	34,8	33,7	15,7	15,8	2,17	-
<i>Clostr. valerianicum</i>	35,1	33,1	16,2	15,6	2,14	+
<i>Clostr. bifermentans</i>	34,0	33,5	17,0	15,5	2,08	+
<i>Strep. foetidus</i>	32,1	34,3	16,8	16,8	1,97	+
<i>Micr. asaccharolyticus</i>	31,2	34,7	18,8	15,3	1,91	+
<i>Veillonella parvula</i>	31,7	31,8	18,5	18,0	1,74	-
<i>Ristel. insolit. N.I.12</i>	29,3	29,5	20,7	20,5	1,43	-
" " <i>I.S.9</i>	28,2	28,6	23,2	20,0	1,31	-
<i>Corynebacterium acnes</i>	26,3	25,8	21,1	26,8	1,08	+
<i>Bifidibact. bifidum</i>	21,9	20,5	28,3	29,3	0,74	+
<i>Corynebacterium parvum</i>	21,5	20,3	29,8	28,4	0,72	+
<i>Fusiformis polymorphus</i>	20,7	20,4	29,9	29,0	0,70	-

(B) qu'un écart considérable existe entre les valeurs des rapports $\frac{A + T}{G + C}$ suivant les différentes espèces bactériennes.

A. — RAPPORT BASES PURIQUES/BASES PYRIMIDIQUES.

Etant donné que nos analyses ont porté sur 60 souches bactériennes différentes, nous pouvons vérifier la constance de ce rapport et son égalité à l'unité.

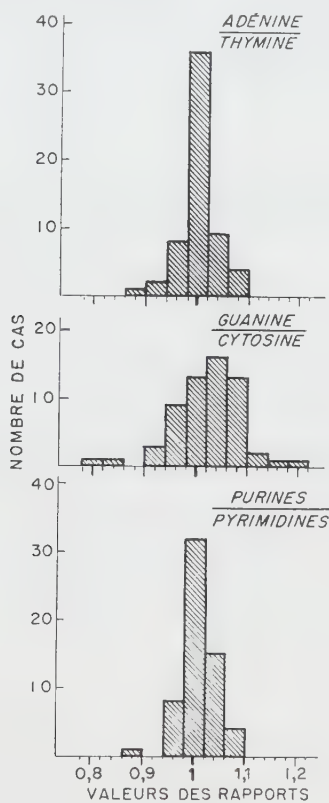


FIG. 1.

L'analyse statistique et l'étude des diagrammes, figure 1, la confirment :

1° Pour les rapports $\frac{A}{T}$ et $\frac{Pu}{Py}$ moyenne, médiane et mode

coïncident dans la classe $1,00 \pm 0,02$. Les moyennes sont très proches de 1 (1,004 et 1,012) et l'écart type est dans les deux cas de 0,035.

2° Pour le diagramme $\frac{G}{C}$ la moyenne s'éloigne un peu plus de 1 (1,027) et l'écart type est de 0,074, ce qui montre que la dispersion est un peu plus grande. Cependant, le calcul montre que les chances pour que ces écarts soient significatifs sont faibles. Toutefois, il y a des raisons de penser que les deux valeurs les plus faibles qui concernent *Corynebacterium* (aérobie et anaérobie) représentent un cas particulier, car l'expérience montre qu'elles sont reproductibles. Nous ne pouvons pas actuellement en donner une interprétation.

$$B. \text{ — RAPPORT } \frac{A + T}{G + C}.$$

En comparant les valeurs, obtenues pour les germes appartenant à chaque famille, genre et espèce de la classification de Bergey [20], on fait les constatations suivantes (2) :

1° FAMILLE DES *Micrococceae*.

GENRE *Micrococcus*.

Chez *Micrococcus aureus* et *Micrococcus albus*, le rapport est très grand et le même pour toutes les espèces examinées : $2,2 \pm 0,06$.

Micrococcus asaccharolyticus (espèce anaérobie) s'en rapproche avec un rapport de 1,91.

Chez *Micrococcus lysodeikticus*, au contraire, le rapport est très petit : 0,4.

DANS LE GENRE *Sarcina* : *Sarcina flava* et *Sarcina lutea* ont le même rapport : $0,5 \pm 0,05$.

2° FAMILLE DES *Lactobacteriaceae*.

GENRE *Streptococcus*. — Toutes les espèces examinées ont donné le même résultat : $1,93 \pm 0,04$. Le caractère anaérobie n'entraîne donc pas ici de différences dans le rapport $\frac{A + T}{G + C}$.

GENRE *Diplococcus*. — *Diplococcus pneumoniae* analysé par Daly et coll. [3] a donné une valeur un peu inférieure : 1,6.

Dans deux autres genres décrits par Prévot [21] et rattachés

(2) Nous suivrons la classification de Bergey [20], et nous discuterons ensuite les relations entre la constitution des acides nucléiques et les divisions de cette classification.

par Bergey [20] à la même famille, nous avons obtenu des résultats très différents : *Ramibacterium ramosum* donne un rapport de 2,32 et *Bifidibacterium bifidum* de 0,74.

3° FAMILLE DES *Bacillaceae*.

GENRE *Bacillus* : *B. cereus* donne des chiffres de 1,75 à 2,00.

Chez *Bacillus cereus* et les espèces voisines, *alesti* et *thurin-giensis*, les rapports sont proches l'un de l'autre, compris entre 1,75 et 2,00.

B. megaterium (rapport 1,66) et *B. subtilis* (1,36) en sont éloignés significativement.

GENRE *Clostridium* (comprenant les genres *Welchia* et *Plectridium* de Prévot [21]).

Ont été analysés : *Cl. valerianicum*, *Welchia perfringens* var. Fred. et *Plectridium saprogenes*.

On trouve ici des valeurs très grandes, variant de 2,08 à 2,7 ; la valeur 2,7 de *W. perfringens* est la plus grande que nous ayons trouvée.

4° FAMILLE DES *Corynebacteriaceae*.

GENRE *Corynebacterium* : *C. diphtheriae* et deux espèces anaérobies : *C. parvum* et *C. acnes*, donnent des chiffres de 0,72 à 1,08 avec des différences significatives entre les espèces.

5° FAMILLE DES *Parvobacteriaceae*.

GENRE *Pasteurella*. — Le rapport est de $1,7 \pm 0,05$.

GENRE *Bacteroides*. — Nous avons examiné deux espèces, classées par Bergey [20] dans le genre *Bacteroides* et qui, pour Prévot [21], appartiennent à la famille des *Ristellae* (rapports trouvés : $1,39 \pm 0,06$ pour *R. insolita* et 2,2 pour *R. clostridiformis*).

GENRE *Fusobacterium* de Bergey, appartient pour cet auteur à la tribu des *Bacteroideae*. Ce genre est rattaché par Prévot sous le nom de *Fusiformis* à la famille des *Spherophoraceae*. Nous avons trouvé pour *Fusiformis fusiformis* un rapport de 2,17 et pour *Fusiformis polymorphus* de 0,7.

GENRE *Hemophilus*. — Dans la littérature [8] nous trouvons pour *H. influenzae* le rapport 1,64.

6° FAMILLE DES *Enterobacteriaceae*.

GENRE *Escherichia*. — Pour *E. coli* le rapport est de 1, d'après plusieurs auteurs [5, 7].

GENRE *Aerobacter*. — Pour *A. aerogenes* nous trouvons un rapport de 0,75, ce qui est un peu différent de celui d'*Escherichia* bien que les deux genres soient rattachés à la même tribu.

GENRE *Salmonella*. — Quatre espèces donnent le même rapport de 1.

GENRE *Shigella* (même tribu que *Salmonella*) donne aussi le rapport 1.

GENRE *Serratia*. — *Serratia marcescens* avec un rapport de 0,72.

GENRE *Proteus*. — Deux espèces ont donné le même rapport de $1,70 \pm 0,04$.

7° FAMILLE DES *Neisseriaceae*.

GENRE *Neisseria*, le rapport est de 1 pour deux espèces examinées.

GENRE *Veillonella* avec un rapport de 1,7, pour *V. parvula*.

8° FAMILLE DES *Pseudomonaceae*.

GENRE *Pseudomonas*. — Trois espèces ont été examinées, le rapport était de 0,48 pour *P. tabaci*, de 0,59 pour *P. fluorescens* et de 0,51 à 0,56 pour quatre variétés de *P. aeruginosa*.

9° FAMILLE DES *Rhizobiaceae*.

GENRE *Agrobacterium*. — Deux variétés d'*A. tumefaciens* donnent un rapport de $0,71 \pm 0,01$.

10° FAMILLE DES *Mycobacteriaceae*.

Les analyses effectuées par divers auteurs ont donné des chiffres compris entre 0,42 et 0,61 (suivant les espèces) [2, 5, 9].

Discussion.

I. En comparant LES VALEURS DU RAPPORT $\frac{A + T}{G + C}$ à la place qu'occupent les souches examinées dans la classification, on peut faire les remarques suivantes :

1° Chaque espèce a un rapport sensiblement constant.

Il est constant, aux erreurs d'expériences près, dans presque tous les cas, aussi bien pour des souches natives que pour des mutants sélectionnés ; par exemple, une souche sensible et une

souche résistante au phage D₄ de *S. enteritidis* var. Danysz ; une souche exigeante en acide nicotinique et une souche non exigeante de *Shig. parendysenteriae*. Cependant, chez un mutant de *B. cereus* var. *afesti* obtenu par culture en milieu alcalin, mutant qui a perdu la propriété de produire des cristaux, le rapport est passé de 2 à 1,8, différence significative.

2° Chez la plupart des espèces appartenant au même genre de la classification de Bergey, le rapport est du même ordre de grandeur.

Mais il y a des exceptions :

a) *Micrococcus lysodeikticus* (rapport 0,4) est très différent des autres espèces de *Micrococcus* examinées (rapport aux environs de 2).

b) De même pour *Fusiformis fusiformis* (rapport 2,17) et *Fusiformis polymorphus* (rapport 0,7).

Dans le premier cas on peut se demander si *M. lysodeikticus* n'appartient pas en réalité à un genre différent du genre *Micrococcus*, comme le pense Prévot [21], qui le classe même dans une tribu différente. Dans sa classification, *M. lysodeikticus* se trouve dans la même tribu que les Sarcines ; et la sensibilité au lysozyme, ainsi que les résultats indiqués ici, semblent des arguments en faveur de cette conception.

3° Dans chaque famille, certains genres ont des valeurs très proches, tandis que d'autres s'éloignent considérablement les uns des autres.

4° La valeur du rapport $\frac{A + T}{G + C}$ paraît donc un caractère lié à l'espèce, ce qui est en accord avec le rôle de support de la spécificité génétique attribué aux ADN. On pourrait peut-être utiliser ce rapport comme critère supplémentaire pour une classification en genres. En effet, il y a des raisons de penser que deux espèces ayant des rapports très différents sont d'origine différente. Par contre, le fait d'avoir le même rapport ne permet à lui seul aucun rapprochement entre des espèces.

II. LA RÉACTION DE GRAM NE PARAÎT PAS EN RELATION DIRECTE AVEC LA VALEUR DU RAPPORT.

III. Si l'on compare l'ensemble des souches AÉROBIES à l'ensemble des souches ANAÉROBIES, on voit que toutes les valeurs existent dans les deux séries.

Dans les cas étudiés, les souches anaérobies diffèrent très peu ou ne diffèrent pas des souches aérobies du même genre.

IV. Si nous voulons INTERPRÉTER LES DIFFÉRENCES DE CONSTITUTION QUE NOUS AVONS TROUVÉES POUR LES ADN des diverses espèces bactériennes, nous pouvons envisager deux possibilités :

1° Toutes les bactéries contiendraient des ADN ayant des constitutions chimiques très différentes, mais certaines bactéries seraient plus riches en ADN à prédominance d'adénine et thymine, certaines seraient plus riches en ADN à prédominance de guanine et de cytosine, et enfin certaines auraient une proportion égale des deux types d'ADN. Ceci serait en accord avec les données de Brown et Watson [22] et de Chargaff et coll. [23], qui ont montré que certaines préparations d'ADN pouvaient être fractionnées en ADN de constitutions chimiques différentes.

2° Tous les ADN extraits à partir d'une bactérie se ressembleraient par leur contenu en bases puriques et pyrimidiques. Les différences que nous trouvons entre les diverses bactéries seraient significatives ; elles seraient ici qualitatives alors qu'elles étaient quantitatives dans la première alternative.

Si l'on regarde de plus près les résultats de fractionnement [22, 24], on constate que l'on a obtenu, surtout pour les bactéries, des fractions de constitutions très proches de la valeur moyenne des ADN, ce qui constitue un argument en faveur de la deuxième alternative (3).

Par ailleurs, les molécules d'ADN que nous obtenons en solution et que nous soumettons aux expériences de fractionnement contiendraient au moins une centaine de gènes [25]. Or, comme c'est peut-être au niveau des gènes qu'il faudrait rechercher une constitution chimique particulière, les expériences de fractionnement des ADN extraits d'une bactérie ne constituent plus, dans l'état actuel de nos connaissances, un argument de poids pour aucune des deux alternatives posées.

Remarquons toutefois qu'il n'est pas nécessaire, pour interpréter la spécificité d'un ADN, de considérer les proportions des diverses bases, l'ordre d'enchaînement étant suffisant pour interpréter cette spécificité.

Mais si l'ADN est le support de la spécificité génique, le problème de la répercussion de sa structure chimique sur les autres constituants cellulaires se pose. Jusqu'à présent, dans les cas où l'on possède des données, on ne voit pas de relations directes entre le contenu en bases des ADN et des ARN d'une même cellule [26, 27]. Il serait encore plus difficile de rechercher

(3) Notons que, d'après la quantité d'ADN de nos préparations et le poids moléculaire attribué aux molécules d'ADN en solution, nous pouvons calculer pour chaque bactérie un nombre qui ne dépasse pas quelques milliers de molécules d'ADN, ce qui limite les chances d'avoir une grande variété de constitution.

des relations entre la constitution des acides nucléiques et celle des protéines.

Résumé.

Pour certaines bactéries pour lesquelles l'extraction par la soude était insuffisante, le broyage ou la lyse par le lysozyme ont permis l'extraction complète des acides désoxyribonucléiques.

On a vérifié sur les 60 souches analysées que les rapports adénine sur thymine, guanine sur cytosine et purines sur pyrimidines sont constamment égaux à l'unité.

Le rapport adénine plus thymine sur guanine plus cytosine, qui paraît un caractère lié à l'espèce, peut prendre au contraire toutes les valeurs entre 0,40 et 2,7.

Chez la plupart des espèces appartenant au même genre de la classification de Bergey, ce dernier rapport est du même ordre de grandeur.

Il y a cependant des exceptions, dont certaines pourraient faire envisager des modifications de cette classification.

La valeur de ce rapport ne paraît en relation directe ni avec le caractère Gram, ni avec le caractère aérobie ou anaérobie des bactéries.

SUMMARY.

With certain bacteria, the extraction by soda is not sufficient for the extraction of desoxyribonucleic acids. Grinding, or lysis by lysozyme, have allowed this extraction. With the 60 strains studied, the ratios adenine/thymine (A/T), guanine/cytosine (G/C), purines/pyrimidines (Pu/Py) are always equal to 1. On the contrary, the ratio $\frac{A + T}{G + C}$ seems to be a character bound to the species; it may have any value between 0,4 and 2,7.

In most species belonging to the same genus in Bergey's classification, this last ratio is of the same order. There are however exceptions, some of which might suggest modifications of this classification.

The value of this ratio does not seem to have any direct relationship either with the Gram character, or with the aerobic or anaerobic character of the bacteria.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHARGAFF E., VISCHER E., DONIGER R., GREEN C. et MISANI F. *J. biol. Chem.*, 1949, **177**, 405.
- [2] VISCHER E., ZAMENHOF S. et CHARGAFF E. *J. biol. Chem.*, 1949, **177**, 429.

- [3] DALY M. M., ALLFREY V. G. et MIRSKY A. E. *J. gen. Physiol.*, 1950, **33**, 497.
- [4] CHARGAFF E., ZAMENHOF S., BRAWERMAN G. et KERIN L. *J. amer. chem. Soc.*, 1950, **72**, 3825.
- [5] SMITH J. D. et WYATT G. R. *Biochem. J.*, 1951, **49**, 144.
- [6] WYATT G. R. *Biochem. J.*, 1951, **48**, 584.
- [7] GANDELMAN B., ZAMENHOF S. et CHARGAFF E. *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, **9**, 399.
- [8] ZAMENHOF S., BRAWERMAN G. et CHARGAFF E. *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, **9**, 402.
- [9] LALAND S. G., OVEREND W. G. et WEBB M. J. *chem Soc.*, 1952, 3224.
- [10] WYATT G. R. et COHEN S. S. *Biochem. J.*, 1953, **55**, 774.
- [11] WYATT G. R. *J. gen. Physiol.*, 1953, **36**, 201.
- [12] HURST R. D., MARKS A. M. et BUTLER G. C. *J. biol. Chem.*, 1953, **204**, 847.
- [13] SCHNEIDER W. C. *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 293.
- [14] DISCHE Z. *Mikrochemie*, 1930, **8**, 4.
- [15] SEVAG M. G., LACKMAN D. B. et SMOLENS J. J. *J. biol. Chem.*, 1938, **124**, 425.
- [16] VISCHER E. et CHARGAFF E. *J. biol. Chem.*, 1948, **176**, 703.
- [17] REDDI K. K. *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, **15**, 585.
- [18] ZAMENHOF S. et CHARGAFF E. *J. biol. Chem.*, 1950, **187**, 1.
- [19] SHERRATT H. S. A. et THOMAS A. J. *J. gen. Microbiol.*, 1953, **8**, 217.
- [20] *BERGEY's Manual determinative bacteriology*. Sixth Edition, 1948, Baillières, Paris, Tindall et Cox, Londres.
- [21] PRÉVOT A.-R. *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1948.
- [22] BROWN G. L. et WATSON M. *Nature*, 1953, **172**, 339.
- [23] CHARGAFF E., CRAMPTON C. F. et LIPSCHITZ R. *Nature*, 1953, **172**, 289.
- [24] CRAMPTON C. F., LIPSHITZ R. et CHARGAFF E. *J. biol. Chem.*, 1954, **211**, 125.
- [25] BENZER S. *Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1955, **41**, 344.
- [26] ELSON D. et CHARGAFF E. *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 367.
- [27] DUTTA S. K., JONES A. S. et STACEY M. J. *J. gen. Microbiol.*, 1956, **14**, 1.

LA RÉSISTANCE NATURELLE DES STAPHYLOCOQUES AU CHLORAMPHÉNICOL.

FRÉQUENCE DES VARIANTS SENSIBLES. PRODUCTION D'UNE SUBSTANCE ANTAGONISTE DU CHLORAMPHÉNICOL.

par Y. CHABBERT et J. DEBRUGE (*).
(Avec la collaboration technique de M^{lle} J. HERVÉ).

(Institut Pasteur. Laboratoire de l'Hôpital)

La grande difficulté d'obtenir au laboratoire des staphylocoques résistants au chloramphénicol est une notion bien établie. Demerec [4] a classé la résistance à cet antibiotique dans le type à multiples échelons. Les auteurs qui se sont occupés de résistance par passage en milieu solide ou liquide insistent sur les faibles taux de résistance obtenus. Pansy et coll. [9], Monnier [8], Kaipainen [5], Wrigt et coll. [13], après 7 à 25 passages, notent que la variation de sensibilité est nulle ou minime, ils ont rarement pu atteindre une résistance quatre fois supérieure à celle des souches primitives. Ces souches étant habituellement inhibées par des taux de l'ordre de 3 à 5 $\mu\text{g/ml}$, on ne peut obtenir des cultures poussant dans plus de 10 à 15 $\mu\text{g/ml}$. Dans un cas cependant, Monnier [8] a trouvé une souche qui, en un seul passage, a atteint un taux de résistance élevé dépassant 100 $\mu\text{g/ml}$.

Cette résistance semble être assez stable, du moins au cours d'un petit nombre de subcultures sans antibiotique.

En clinique, il n'existe pas d'observation certaine de résistance d'un staphylocoque au chloramphénicol, acquise suivant le mécanisme précédent. Par contre, on isole couramment des staphylocoques beaucoup plus résistants que ceux obtenus *in vitro*, puisqu'ils ne sont inhibés que par des taux se trouvant entre 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ et que l'on peut appeler « résistants naturels au chloramphénicol ». Le pourcentage de ces souches, lors de l'apparition du chloramphénicol, était de l'ordre de 2 p. 100. Par sélection, ce pourcentage s'est élevé aux environs de 12 p. 100

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 avril 1956.

en 1952. Il s'est maintenu à ce taux en France [41], mais a régressé dans les pays anglo-saxons lorsque l'on a restreint l'usage de cet antibiotique. Cette résistance est habituellement considérée comme stable.

La recherche de phénomènes de synergie entre les antibiotiques et certaines vitamines a conduit l'un de nous à observer des modifications de sensibilité des souches. Ce travail repris systématiquement a montré que la vitamine B₂ ne jouait aucun rôle dans ces modifications, mais que dans les souches naturellement résistantes au chloramphénicol il était possible de mettre en évidence des variants sensibles.

Ce fait peut être rapproché de phénomènes divers observés avec d'autres antibiotiques : chez les staphylocoques, M. Barber [4] a signalé la fréquence de l'apparition spontanée de variants non producteurs de pénicilline chez les souches productrices. M. Welsch [12] a montré qu'il existait un antagonisme entre les staphylocoques sensibles et résistants à la streptomycine.

Chez des coliformes, Lederberg [7] a étudié les mutations reverses de résistance à la streptomycine par recombinaison et Pitillo et Foster [10] ont obtenu, à partir de cultures résistantes, une substance produite uniquement en milieu synthétique, capable d'inhiber divers antibiotiques.

A la lumière de ces faits, nous avons cherché : la fréquence et les conditions d'apparition des variants sensibles au chloramphénicol, l'antagonisme possible entre les éléments résistants et leurs variants sensibles, enfin la production éventuelle d'une substance inhibitrice par les éléments résistants.

A. — FRÉQUENCE DES VARIANTS SENSIBLES DANS LES SOUCHES NATURELLEMENT RÉSISTANTES.

TECHNIQUES. — a) Purification des souches. Bien qu'étant partis de culture en collection depuis un an, nous avons cherché à réisoler une culture résistante pure en faisant 10 passages sur une gélose contenant 50 µg/ml de chloramphénicol. A chaque passage une colonie isolée était émulsionnée et diluée suffisamment pour donner des colonies très isolées sur la boîte suivante. Ces suspensions donnaient à l'examen microscopique 90 p. 100 de germes isolés ; il est très probable que l'on a pu constituer des cultures issues à un moment donné d'un germe unique.

b) Isolement des variants sensibles. A partir d'une culture de 16 heures en milieu liquide, on fait une dilution suffisante pour obtenir environ 100 colonies sur une boîte de Petri. Après croissance, la présence de variants sensibles a été décelée de deux façons :

1° Par repiquage direct de 25 à 50 colonies sur une gélose

contenant 10 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphénicol et une gélose n'en contenant pas.

2° Par la méthode des répliques sur velours de Lederberg [6] en suivant quelques modifications apportées par Blondel et Welsch [2].

c) Contrôle des souches. A chaque stade les variants sont testés vis-à-vis de 10 antibiotiques par la méthode des disques et, dans certains cas, le type bactériophagique a été déterminé par M^{lle} J. Fouace. Les concentrations inhibitrices exactes ont été déterminées par dilution en gélose au moyen de la technique des stries.

d) L'isolement de mutants résistants a été essayé par la méthode Demerec en ensemençant environ 10^7 germes sur des géloses contenant des doses variables d'antibiotique.

e) Etude du comportement des mélanges. Des mélanges à 50 p. 100 de la souche originelle résistante et de son variant sensible ont été cultivés en des temps variables sur des milieux de richesse différente. A chaque passage les pourcentages respectifs d'éléments résistants et sensibles étaient déterminés par la méthode précédente (a).

RÉSULTATS. — D'abord, en étudiant la présence de variants sensibles parmi 9 souches de collection qui avaient été conservées en raison de leur résistance au chloramphénicol, nous avons observé que 3 d'entre elles étaient devenues entièrement sensibles. Parmi celles-ci, une d'entre elles avait servi de souche-test pour le titrage de l'érythromycine en présence de tétracycline ou de chloramphénicol sans avoir présenté jusque-là de modifications apparentes. Il était possible, quoique improbable, que ces souches aient été à l'origine composées d'un mélange, aussi les 6 souches restantes ont été purifiées suivant la technique indiquée plus haut.

La recherche de variants sensibles sur 5 subcultures en milieu liquide a été négative chez 4 souches. Dans les 2 souches restantes, on observe les faits suivants :

Une première souche (CHE) après 7 subcultures de 24 heures en bouillon ordinaire a montré brusquement 30 p. 100 d'éléments sensibles.

Une deuxième souche (SIG) a montré après 5 subcultures 60 p. 100 d'éléments sensibles.

Ce phénomène a pu être reproduit avec cette souche à quatre reprises différentes : dans un cas, après une seule subculture négative, on a obtenu à la seconde 2 p. 100 de colonies sensibles et dans un autre cas 5 p. 100 après 3 cultures.

La sensibilité des variants ainsi obtenus est d'emblée totale. Ils sont inhibés par des concentrations inférieures à 5 $\mu\text{g/ml}$ alors

que les souches originelles sont inhibées par 50 à 100 µg/ml dans les conditions habituelles que nous utilisons. Tous les variants possèdent le même type de sensibilité que la souche primitive à 9 autres antibiotiques, il s'agit du reste de souches polymyxiques, et elles sont de même type bactériophagique.

Aucune influence d'un milieu de culture particulier ou de la présence de vitamine B₂ n'a pu être prouvée.

Etant donné le rôle manifeste du hasard dans l'apparition et la fréquence de ces variants, il s'agit probablement d'une mutation reverse supprimant complètement la résistance en un échelon.

Cependant les pourcentages élevés de variants observés dans certains cas (30 à 60 p. 100) posent le problème de leur sélection sous une influence quelconque. Nous avons recherché s'il n'existait pas un antagonisme entre ces variants sensibles et les éléments résistants.

Dans ce but, nous avons fait des mélanges à 50 p. 100 du variant sensible et de la souche originelle et avons recompté la proportion au cours de subcultures répétées sur deux milieux différents et après des temps de culture variables. A trois reprises différentes, nous avons fait 5, 7 et 9 passages avec la souche SIG., sans que les variations des éléments sensibles trouvés d'un jour à l'autre montrent des changements statistiquement significatifs.

Nous avons recherché si les 2 souches qui ont montré un haut pourcentage de variants sensibles ne présentaient pas une aptitude particulière à donner des résistants d'un taux élevé en un seul échelon comme la souche observée par Monnier. L'isolement de tels mutants a toujours été négatif avec la technique de Demerec.

Cette mutation reverse se présente donc avec un caractère de fréquence assez inhabituel bien qu'assez voisin de celui observé par M. Barber pour la production de pénicilline.

B. — PRODUCTION D'UNE SUBSTANCE INHIBITRICE DU CHLORAMPHÉNICOL PAR LES SOUCHES RÉSISTANTES.

TECHNIQUES. — Nous avons utilisé la technique de diffusion, consistant à incorporer dans une gélose une quantité de chloramphénicol suffisante pour inhiber les souches sensibles sans inhiber le variant résistant ; à ensemercer les souches sensibles en stries parallèles et les souches productrices perpendiculairement. On observe les phénomènes de satellitisme qui peuvent indiquer que l'antibiotique a été détruit. Nous avons employé aussi la technique pour la mise en évidence de la production de pénicilline, publiée antérieurement par l'un de nous avec B. Sureau [3].

Nous avons enfin découpé à l'emporte-pièce des petits cylindres d'une gélose contenant du chloramphénicol, sur laquelle avait été

cultivée soit la souche originelle résistante, soit le variant sensible et nous avons titré le chloramphénicol par une méthode de diffusion horizontale.

RÉSULTATS. — En opérant dans ces conditions, on observe des phénomènes identiques à ceux observés avec les souches productrices de pénicillinase. Les souches de staphylocoques résistantes au chloramphénicol produisent donc une substance diffusible en gélose capable d'inhiber l'action de cet antibiotique. Cette substance protège non seulement les variants sensibles mais toutes les souches sensibles d'autres espèces microbiennes. Elle est produite dans les milieux ordinaires et elle est donc différente de celle mise en évidence par Pitillo et Foster [40].

Les essais qualitatifs relatés ici se prêtent mal à une évaluation de l'intensité de cette action. Les recherches complémentaires seront publiées ultérieurement. Bien que très nette, l'action destructrice de cette « chloromycétinase » ne semble pas devoir se comparer à celle de la pénicillinase et nous n'avons pu obtenir que des inhibitions de solutions titrant de 20 à 50 µg/ml.

RÉSUMÉ.

Les souches de staphylocoques naturellement résistantes isolées en clinique peuvent présenter une mutation reverse, susceptible de donner un taux très élevé de variants sensibles. Les souches résistantes de staphylocoques produisent dans les milieux ordinaires une substance diffusible en gélose, capable d'inhiber l'action de doses de chloramphénicol inhibitrices pour les souches sensibles.

SUMMARY.

Spontaneously resistant strains of *Staphylococcus* isolated from patients, may undergo a reverse mutation, which can yield a very high proportion of susceptible variants. The resistant strains produce in usual media a substance, diffusible in agar, able to inhibit the action of doses of chloramphenicol that would prevent the multiplication of susceptible strains.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARBER (M.). *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 274.
- [2] BLONDEL (B.) et WELSCH (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1489.
- [3] CHABBERT (Y.) et SUREAU (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 562.
- [4] DEMEREC (M.) et DEMEREC (R.). *Bact. Proc.*, 1950, 101.
- [5] KAIPAINEN (W. J.). *Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae*, 1951, **29**, Suppl. 1.

- [6] LEDERBERG (J.) et LEDERBERG (E. M.). *J. Bact.*, 1952, **63**, 399.
- [7] LEDERBERG (J.). *J. Bact.*, 1951, **61**, 549.
- [8] MONNIER (J.). *Les antibiotiques et les maladies de l'enfance*. C. I. E., Paris, 1952, 201.
- [9] PANSY (F. E.), KHAN (P.), PAGANO (J. F.) et DONOVICK (R.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **75**, 618.
- [10] PITILLO (R. F.) et FOSTER (J. W.). *Antib. Annual*, 1954-1955, 178.
- [11] TERRIAL (G.) et CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 777.
- [12] WELSCH (M.). *Bull. Acad. Roy. Méd. Belgique*, 1950, **45**, 454.
- [13] WRIGHT (S. S.), PURCELL (E. M.), WILCOX (C.), BRODERICK (M.) et FINLAND (M.). *J. Lab. clin. Med.*, 1953, **42**, 877.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTI-BACTÉRIENNES DE LA GELÉE ROYALE.

EFFETS BACTÉRICIDE ET ANTIBIOTIQUE DE LA GELÉE ROYALE NEUTRALISÉE

par CLAUDE HELLEU (*).

[*Laboratoire d'Analyses médicales, vétérinaires et agricoles.*
CL. HELLEU, *Livarot (Calvados)*]

INTRODUCTION.

Lors d'une étude sur la conservation de la gelée royale (Helleu [3]), nous avons déjà attiré l'attention sur le fait que cet aliment naturel des jeunes larves d'abeilles et des reines, d'une grande richesse en substances nutritives et en facteurs de croissance (appartenant surtout aux vitamines du groupe B), aurait pu apparaître comme un milieu favorable au développement des micro-organismes.

En réalité, malgré sa composition, la gelée royale pure demeure stérile et imputrescible, et on a remarqué que le tube digestif des abeilles-reines, seules nourries de gelée royale, est exempt de bactéries. Ces faits conduisent naturellement à supposer l'existence dans la gelée royale (G. R.) d'un facteur anti-bactérien.

Mac Cleskey et Melampy [6] ont, les premiers, en 1938, signalé cette action anti-bactérienne de la G. R., à laquelle ils ont attribué des propriétés bactéricides et bactériostatiques très marquées. Malheureusement ces auteurs n'ont pas donné le détail de leurs conditions opératoires.

Depuis ces premières observations, il ne semble pas, à notre connaissance, que les chercheurs se soient penchés à nouveau sur le problème des propriétés anti-bactériennes de la G. R. C'est pourquoi il nous a paru utile de reprendre cette question, en précisant exactement nos conditions d'expérience.

Nous avons choisi, pour commencer nos essais, deux germes très communs et assez différents : un staphylocoque et un coli-

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 avril 1956.

bacille. Nos recherches dans ce sens étaient déjà en cours, lorsque nous avons eu connaissance de deux communications récentes de M. Hinglais et de ses collaborateurs, sur le pouvoir microbicide de la G. R. : l'une concernant le bacille de Koch [5], l'autre *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris* [4]. Malheureusement cette dernière communication n'étant pas encore publiée, nous ne connaissons pas les détails opératoires de ces auteurs, qu'il serait intéressant de comparer aux nôtres, comme nous le verrons plus loin.

Un autre fait important avait également attiré notre attention, c'est l'acidité naturelle de la G. R. (pH 4,2 à 5 d'après nos propres essais). Comme le rapportaient récemment Egger et Zabey [2], certains ont voulu voir dans cette franche acidité le seul facteur anti-microbien de la G. R. C'est pourquoi nous avons décidé d'effectuer nos propres recherches sur de la G. R. *préalablement neutralisée*.



TECHNIQUE DE MESURE DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE DE LA GELÉE ROYALE.

Pour mesurer les propriétés antibiotiques éventuelles de la G. R., nous avons choisi pour sa commodité la méthode classique des dilutions en milieu liquide. Comme le trouble naturel des dilutions de G. R. aurait gêné l'observation directe du développement microbien, nous avons adapté à la G. R. la technique de Sureau et Chabbert [4, 7, 8]. Cette technique utilise comme milieu liquide une eau peptonée additionnée de glucose et de phénol-sulfone-phtaléine (P. S. P.) dont le virage témoigne du développement microbien.

Cet artifice présentait également l'avantage, dans le cas particulier de nos essais, de fournir dès le départ un témoin du pH à la fois du milieu de culture et de la G. R. préalablement neutralisée par la soude diluée en présence de P. S. P., et ajustés de la sorte à un pH identique.

Souches microbiennes : Nous avons utilisé pour ces premiers essais :

1° Un *staphylocoque*, *Staphylococcus aureus*, souche Londres couramment employée pour les dosages d'antibiotiques, et qui nous a été fournie par l'Institut Pasteur.

2° Un *colibacille*, souche pathogène non cataloguée, isolée d'une urine de malade.

Solution au 1/10 de G. R. neutralisée : Nous avons utilisé plusieurs échantillons de G. R., aussi bien de gelée royale pure fraîche (G. R. P. F.) que de gelée royale pure lyophilisée (G. R. P. L.).

Des solutions neutres au 1/10 exactement ont été préparées en ajoutant une quantité juste suffisante de soude diluée (environ normale) en présence de P. S. P. Il nous est apparu qu'en opérant aseptiquement il était inutile de stériliser ces solutions par la chaleur même modérée (d'autant plus que le facteur antibiotique de la G. R. est peut-être thermolabile).

Pour les dosages, chaque solution neutre au 1/10 est additionnée d'un volume égal de milieu de culture glucose-P. S. P. On obtient ainsi une *solution-mère de G. R. neutre au 1/20*, qui sert à préparer par mélanges successifs au milieu liquide une *gamme de dilutions* croissantes. Cette gamme est répartie aseptiquement dans une série de 7 tubes à hémolyse, ainsi qu'il apparaît dans le tableau I.

TABLEAU I.

DOSAGE DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE DE LA G.R. PAR UNE METHODE DE DILUTION							
Rôle des tubes	T.S.	Gamme des dilutions de G.R. neutre					T.V.
N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7
Taux de dilution de la G. R.	1/20	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	-
Milieu de culture	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1 ml.
Dilution de G.R. (de titre décroissant.)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0 ml.
Suspension micro- bienne à 1%	0	II	II	II	II	II	II gouttes
Porter à l'étuve à 37° C.							

Pour assurer la sécurité du dosage nous l'avons encadré entre deux *tubes-témoins* :

1° Un *témoin de stérilité* (T. S., n° 1) de l'ensemble milieu de culture + G. R. dilué (non ensemencé), qui ne doit jamais virer et qui indique que les manipulations ont été effectuées aseptiquement.

2° Un *témoin de virage* (T. V., n° 7) de l'ensemble germe étudié + milieu glucose-P. S. P. (sans gelée royale), qui doit normalement virer le premier, en passant du rouge au jaune.

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION.

A. COLIBACILLE. — Malgré plusieurs essais successifs, nous n'avons jamais pu mettre en évidence, dans nos conditions expérimentales, un pouvoir antibiotique vis-à-vis du colibacille de la G. R. neutralisée, aux dilutions de 1/20 à 1/320.

Nos résultats s'opposent donc à ceux de Mac Cleskey et Melampy [6] qui déclarent avoir obtenu, avec une dilution au 1/50 de G. R. en bouillon nutritif, l'inhibition d'*Escherichia coli* (et d'*Eberthella typhosa*). Nous ne connaissons malheureusement pas les détails des conditions opératoires de ces auteurs, qui ne figurent pas dans leur publication.

B. STAPHYLOCOQUE. — Avec *Staphylococcus aureus* (souche Londres) nous avons, par contre, noté une action antibactérienne très nette de la G. R. Le tableau II réunit quelques-uns des résultats que nous avons obtenus sur des échantillons de G. R. de provenance diverses (France, Italie, Maroc).

TABLEAU II.

Dosages des effets antibactériens de la Gelée Royale neutralisée sur staphylocoque (S.Londres)										
Echantillons & Provenances	Observations	T.S.	Gamme des dilutions G. R.					T.V.	Interprétations	
	Tubes N°	1	2	3	4	5	6	7	Dilutions bactéri- cides	Dilutions antibio- tiques
	Taux de dilu- tion G. R.	1/20	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	-		
G.R.P.L. 2 (mélange)	Virage & délai	0 24h	0 24h	+	+	+	+	+	J.q. 1/20	1/40-1/320
G.R.P.L. 7 (mélange)	Virage & délai	0 > 60h	0 > 60h	0 > 60h	+	+	+	+	Jq. 1/40	1/80-1/320
G.R.P.P. 11 (Var)	Virage & délai	0 > 65h	0 > 65h	+	+	+	+	+	Jq. 1/20	1/40-1/160
G.R.P.P. 41 (Italie)	Virage & délai	0 > 100h	0 > 100h	0 > 100h	+	+	+	+	Jq. 1/40	1/80-1/160
G.R.P.P. 13 (Maroc)	Virage & délai	0 > 100h	0 > 100h	0 > 100h	0 > 100h	+	+	+	Jq. 1/80	1/160
G.R.P.P. 14 (Loire)	Virage & délai	0 > 100h	0 > 100h	0 > 100h	+	+	+	+	Jq. 1/40	1/80-1/320

Ces résultats montrent que la G. R. neutralisée manifeste sur le staphylocoque un net *pouvoir antibiotique*, retardant le déve-

loppement microbien aux dilutions extrêmes comprises entre $1/40$ à $1/320$, selon les cas.

Aux concentrations plus élevées (dilutions allant jusqu'à $1/20$, $1/40$ et même $1/80$, selon les cas), la G. R. se comporte comme un véritable bactéricide, interdisant tout développement ultérieur.

Par contre, aux concentrations les plus basses utilisées ($1/320$), nous avons observé que la G. R. non seulement manifestait un pouvoir antibiotique atténué, mais que parfois elle se comportait comme un stimulant de la croissance du germe, le tube n° 6 ($1/320$) virant avant le témoin dépourvu de G. R. (exemples G. R. P. F. 12 et 13). Il est intéressant de noter à ce sujet que ce phénomène peut également s'observer avec les hautes dilutions d'autres antibiotiques, tels l'auroéomycine.

C. ESSAIS SUR LE MIEL. — Nous avons d'autre part effectué des essais comparatifs, avec les mêmes germes et dans les mêmes conditions, en remplaçant la G. R. par du miel, afin de savoir si le miel, qui peut éventuellement se trouver mélangé à la G. R., possédait aussi des propriétés anti-bactériennes.

Les résultats de ces essais ayant été absolument négatifs, il nous semble que les propriétés anti-bactériennes observées sur la G. R. sont assez spécifiques de celle-ci.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Les résultats que nous avons obtenus avec la G. R. sur le staphylocoque confirment ceux de Mc Cleskey et Melampy [6], qui ont observé une action bactéricide nette de la G. R. diluée au $1/10$.

Hinglais et Gautherie [4] ont également noté cet effet bactéricide de la G. R. sur le staphylocoque (après un contact de six heures) ; mais le détail de leurs conditions opératoires n'étant pas encore publié, nous ignorons en particulier les taux des dilutions qu'ils ont utilisées. En revanche ces mêmes auteurs n'ont pas remarqué dans leurs essais que la G. R., ajoutée au milieu de culture en même temps que les germes, ait empêché leur prolifération, et ils contestent que cette substance ait un pouvoir antibiotique réel.

Nous ne sommes pas d'accord avec eux sur ce seul point, nos expériences avec la G. R. neutralisée ayant au contraire nettement mis en évidence un effet *antibiotique*, au sens habituel du terme.

Il faut rappeler cependant que, par ailleurs, Hinglais, Gautherie et Langlade [5] ont observé sur le B. K. le pouvoir antibiotique et bactéricide de la G. R., aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (sur le cobaye).

CONCLUSIONS.

En utilisant une technique spécialement adaptée, de dilutions en milieu de culture liquide (glucose-P. S. P.), nous avons mis nettement en évidence les propriétés anti-microbiennes de la G. R. préalablement neutralisée. Celle-ci se comporte, selon les taux de dilution (variant de 1/20 à 1/320 dans nos essais), soit comme *bactéricide*, soit comme *antibiotique* vis-à-vis du staphylocoque (souche Londres).

La *neutralisation* préalable de l'acidité naturelle de la G. R. (pH 4,2 à 5) nous permet de penser que, si cette acidité peut contribuer à renforcer les propriétés anti-bactériennes de la G. R., elle n'en est pas la cause essentielle. On doit donc admettre qu'il existe dans la G. R. un facteur anti-microbien particulier, assez *spécifique* de cette substance, puisque ces propriétés n'ont pas été retrouvées dans le miel.

Les *effets bactéricides et antibiotiques* de la G. R. semblent, d'autre part, assez *sélectifs*. En effet, nos essais, nettement *positifs* avec le staphylocoque, ont été au contraire complètement négatifs avec le colibacille, malgré des conditions expérimentales absolument identiques.

La confirmation des propriétés antibiotiques, peut-être limitées, mais réelles de la G. R., nous paraît extrêmement intéressante, à un double *point de vue biologique* :

1° Parce que la G. R. constitue un *antibiotique d'origine animale*, caractère encore peu banal.

2° Parce que, connaissant certains des rapports qui existent entre *facteurs de croissance et antibiotiques*, on pourrait envisager sous l'angle d'une telle *synergie* le mécanisme de l'*action biologique de la G. R.*, certainement complexe et encore mal connu.

Il semble que des recherches ultérieures devraient s'efforcer de préciser les conditions exactes et les limites du pouvoir antibiotique de la G. R. sur divers germes, et que l'analyse plus poussée de ce milieu devrait isoler la fraction antibiotique, et peut-être même identifier la substance responsable de cette activité. Nous espérons pouvoir apporter prochainement quelques précisions à ce sujet.

SUMMARY.

The author has utilized a particular technique : dilutions in a liquid culture medium (glucose-phenol-sulfonephthaleine). He has been able to demonstrate the anti-bacterial properties of the royal jelly after neutralisation of its natural acidity. Following the dilution titre (from 1/20 to 1/320), the royal jelly is either bactericidal or antibiotic for *Streptococcus*. Consequently, its

natural acidity is not the main factor of its antibacterial properties; it must possess a particular antibacterial factor. This factor seems to be rather specific, since it has not been found in honey. Moreover, the effect of this factor appears to be rather selective: the experiments, clearly positive with *Staphylococcus*, have been completely negative with *B. coli*.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] CHABBERT (Y.). *Ann. Biol. clin.*, 1948, **6**, 425.
- [2] EGGER (M.) et ZABEY (M.). *Congrès Int. Biogénétique*, Rome, 7-11 avril 1955.
- [3] HELLEU (CL.). *Congrès Int. Biogénétique*, Rome, 7-11 avril 1955.
- [4] HINGLAIS (H. et M.) et GAUTHERIE (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 11 juin 1955.
- [5] HINGLAIS (H. et M.), GAUTHERIE (J.) et LANGLADE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 684.
- [6] MC CLESKEY et MELAMPY (R. M.). *J. Bact.*, 1938, **36**, 324.
- [7] SUREAU (B.) *Ann. Biol. clin.*, 1948, **6**, 445.
- [8] SUREAU (B.) et CHABBERT (Y.). *Biol. méd.*, 1948, **37**, 39.

**LA SYNTHÈSE DU GLYCOGÈNE *IN VITRO*
PAR DES POLYNUCLÉAIRES SANGUINS.
MISE EN ÉVIDENCE
DE FACTEURS FAVORISANTS ET INHIBITEURS.**

par SUZANNE BAZIN, ALBERT DELAUNAY et MICHELLE HÉNON (*)

[C. N. R. S. et Institut Pasteur, Annexe de Garches (S.-et-O.)]

INTRODUCTION.

La synthèse du glycogène dans les tissus hépatique et musculaire a, depuis plus de quinze ans, été largement étudiée *in vitro*. En revanche, pareille étude manque encore pour les leucocytes, bien que l'on sache depuis longtemps que les polynucléaires contiennent du glycogène et souvent en quantité supérieure à celle que l'on trouve d'ordinaire dans les autres cellules de l'organisme.

En 1937, pourtant, Willstätter et Rohdewald [1] avaient montré qu'on peut obtenir une glycogénèse *in vitro* en utilisant des leucocytes du sang de cheval. Mais ce résultat avait retenu l'attention assez peu. Ultérieurement, les mêmes auteurs, et quelques autres, avaient étudié uniquement la glycogénolyse et la glycolyse leucocytaires [2, 3, 4, 5, 6].

Récemment, deux publications ont paru où il est à nouveau question de glycogénèse leucocytaire. La première est de Wagner et Yourke [4]; ceux-ci avaient essayé de reproduire les expériences de Willstätter et Rohdewald mais ils devaient avouer un échec. En revanche, dans la seconde publication, celle de F. Meyer [7], des résultats positifs étaient présentés. Mieux même, la chose semblait étonnamment facile à réaliser puisque, d'après l'auteur, en aérobose comme en anaérobose, les leucocytes sanguins comme les leucocytes inflammatoires sont capables de synthétiser *in vitro* du glycogène à partir du glucose...

Pour notre part, nous avons eu l'occasion à plusieurs reprises [8, 9, 10, 11, 12, 13] d'étudier le taux du glycogène dans les leucocytes; nous avons vu, par exemple, qu'il diminue au cours de la phagocytose [11, 12], qu'il augmente au contraire chez les animaux qui ont reçu de l'ACTH [8, 10].

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} mars 1956.

Ces travaux devaient nous conduire tout naturellement à aborder le problème de la glycogénèse *in vitro*. C'est ce que nous avons fait en précisant, dans un premier temps, quelles étaient les conditions les plus favorables à une synthèse du glycogène par les polynucléaires. Ultérieurement, nous avons examiné l'influence de certains facteurs introduits dans le milieu : glucose, ions K⁺, sérum homologue, insuline.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

I. TECHNIQUE. — Notre *matériel d'étude* a été une suspension leucocytaire obtenue à partir du sang de cheval : 800 ml de sang hépariné sont placés à l'étuve à 37° C dans deux éprouvettes inclinées à 45° ; après vingt minutes de repos, la sédimentation des hématies est suffisante pour qu'on puisse prélever par aspiration la couche plasmatique surnageante, dans laquelle se trouvent la majorité des leucocytes, de rares hématies et des plaquettes. Le liquide recueilli est centrifugé cinq minutes à 1 500 tours ; le culot de leucocytes, contenant peu d'hématies et très peu de plaquettes, est émulsionné soigneusement dans l'eau physiologique et la suspension obtenue est passée sur une gaze pour éliminer les amas leucocytaires. La concentration cellulaire doit se trouver comprise entre 300 000 et 400 000 cellules au millimètre cube. La suspension ainsi définie est alors diluée de moitié dans les divers milieux à étudier (la concentration en cellules devient donc de 150 000 à 200 000 cellules/mm³, et reste identique dans tous les milieux utilisés au cours d'une même expérience).

2 ml de suspension (dans l'un ou l'autre milieu) sont placés dans des fioles de Warburg enduites de silicones (4 à 5 fioles pour chaque milieu étudié, pour chaque expérience).

L'*incubation* est d'une heure trente à 37°, dans l'air, avec agitation de 70 oscillations par minute.

Le *dosage du glycogène* est effectué :

Sur 2 ml de suspension avant incubation ;

Sur 2 ml de suspension après incubation.

(3 à 4 échantillons pour chaque expérience.)

Le procédé de dosage est celui décrit précédemment [8]. Il comporte l'isolement du glycogène par le procédé classique de Pflüger, l'hydrolyse en milieu acide du glycogène purifié, et le titrage du glucose formé par la méthode de Somogyi.

Les résultats sont exprimés en µg de glucose et rapportés à 10⁶ granulocytes neutrophiles. (On sait, en effet, que les seuls éléments sanguins porteurs de glycogène sont les polynucléaires neutrophiles.)

Le pourcentage des diverses cellules contenues dans la suspension est calculé d'après l'établissement de la formule cytologique

sur des frottis de la suspension colorés au May Grünwald Giemsa.

Le contrôle de la vitalité, après incubation, est fait sur des cellules séparées du milieu de suspension par centrifugation et remises dans du sérum frais de cheval : épreuve de tactisme vers des grains d'amidon de pomme de terre selon la technique précédemment décrite [14] et épreuve standard de phagocytose de staphylocoques.

II. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. — 1° *Détermination d'un milieu convenable pour la glycogénèse.* — De nombreux essais ont été effectués dans des milieux de pH divers, contenant des sels variés, à des concentrations différentes. Seules ont été retenues les expériences faites dans des milieux où, après incubation dans les conditions indiquées, les leucocytes ont été retrouvés dans un état apparemment normal :

Aspect inchangé au microscope, tactisme normal (+ + +), phagocytose normale pour le staphylocoque (+ + +).

Le milieu qui nous a paru le plus favorable pour observer une augmentation du glycogène intraleucocytaire est celui dont nous donnons ci-dessous la formule (1) :

Phosphate disodique, 0,0025 M ; phosphate monosodique, 0,0025 M ; chlorure de potassium, 0,0036 M ; chlorure de magnésium, 0,0025 M ; acétate de sodium, 0,018 M ; chlorure de sodium, 0,105 M ; glucose, 0,015 M.

Le pH, avant incubation, est de 7 ; après incubation, de 6,6 à 6,5. L'augmentation du taux des phosphates assurerait un meilleur pouvoir tampon et une valeur plus élevée du pH après incubation, mais elle nous a paru une condition défavorable à la synthèse du glycogène.

Les ions Mg^{++} , sans être indispensables à la glycogénèse, rendent son observation plus régulière.

2° *Rôle du glucose.* — Les leucocytes d'un même prélèvement ont été mis en nombre égal dans deux milieux : l'un contenant du glucose (formule paragraphe I), l'autre ne contenant pas de glucose (formule précédente, dans laquelle le glucose est remplacé par une quantité équivalente de $ClNa$).

Incubation d'une heure trente, dans les conditions indiquées.

Les résultats des titrages de glycogène sont donnés dans le tableau I.

On constate que, dans le milieu privé du glucose, les granulo-

(1) En pratique, on prépare une solution qui contient une proportion de chaque constituant telle que, après dilution au 1/2 par la suspension leucocytaire en eau physiologique, la concentration de chaque constituant soit égale à celle indiquée ici même.

cytes perdent en une heure 0,70 μg de glycogène pour 10^6 cellules. En présence de glucose, ils gagnent 0,73 μg en une heure.

3° Rôle des ions K^+ . — Deux milieux contenant la même quantité de glucose ont été mis en expérience : l'un contenant des sels de Na et de K, dont 1/3 des cations en K^+ (formule paragraphe I), l'autre contenant à mêmes doses les mêmes sels, tous les cations étant à l'état de Na^+ .

TABLEAU I.

Teneur en Glycogène (μg) de granulocytes (10^6)					
Nos des Exp.	Avant Incubation	Après Incubation		Glycogène synthétisé (μg) en 1h. par 10^6 Granulocytes (milieu glucosé)	Glycogène hydrolysé (μg) en 1h. par 10^6 Granulocytes (milieu non glucosé)
		en milieu glucosé	en milieu non glucosé		
1	2,13	2,45	0,98	0,21	0,76
2	3,15	5,51	0,97	1,50	1,45
3	2,05	2,62	1,06	0,88	0,66
4	2,19	3,51	1,19	0,88	0,67
5	2,13	2,80	0,92	0,44	0,80
6	3,15	5,65	1,33	1,65	1,21
7	1,58	2,15	1,19	0,38	0,26
8	2,19	3,51	1,41	0,89	0,52
9	3,26	4,02	2,66	0,50	0,40
10	1,58	2,52	1,19	0,49	0,26
<u>Moyennes</u>	2,54	3,45	1,29	+ 0,73	- 0,70
		(+47,5%)	(-44,9%)	$\sigma = \pm 0,49$	$\sigma = \pm 0,24$

Dans ces deux milieux, incubation des leucocytes d'un même prélèvement, en concentration identique, dans les conditions habituelles.

Les résultats des dosages de glycogène sont donnés dans le tableau II.

D'après ces résultats, on voit que les deux milieux étudiés ont permis une synthèse appréciable de glycogène. A une exception près, la synthèse a toujours été plus forte dans le milieu contenant des ions K^+ . La moyenne donne : augmentation du glycogène, 1,05 μg en présence d'ions Na^+ et d'ions K^+ et 0,61 μg en présence d'ions Na^+ seuls. Le calcul du critère t de Student Fischer conduit à P compris entre 0,01 et 0,05. On peut donc admettre que les ions K^+ favorisent la glycogénèse.

4° *Influence de la présence de sérum frais.* — Incubation d'une quantité égale de leucocytes du même prélèvement dans :

a) Le milieu salin glucosé habituel (formule paragraphe I) ;

b) Un milieu composé de 1 partie de sérum frais de cheval et 3 parties du milieu salin habituel (formule paragraphe I) ; mélange auquel est ajoutée une quantité de glucose convenable pour que la concentration finale en glucose soit la même que celle du milieu a).

TABLEAU II.

Nos des Exp.	Teneur en Glycogène (μg) de Granulocytes (10^6)		Glycogène (μg) synthétisé en 1h. par 10^6 granulocytes	
	Avant Incubation	Après Incubation		
		en milieu avec cations Na + K	en milieu avec cation Na	
II	2,05	2,62	3,18	0,58
I2	2,19	3,61	2,58	0,88
I3	3,15	5,63	5,10	1,82
I4	1,87	3,13	2,50	0,84
I5	1,25	2,80	2,24	1,05
I6	2,70	4,80	3,51	1,40
I7	2,19	3,61	2,42	0,88
I8	1,87	3	2,80	0,75
I9	3,15	5,61	4,82	1,57
20	1,25	2,76	2,17	1,
Moyennes	2,16	3,73	3,09	1,05
				$\sigma = \pm 0,13$
				$\sigma = \pm 0,19$

Les résultats des dosages de glycogène sont donnés dans le tableau III.

L'examen de ce tableau montre qu'une augmentation du glycogène a été observée dans tous les cas. A une exception près, cette augmentation a toujours été plus faible en présence de sérum qu'en son absence. Quantité moyenne du glycogène synthétisé en une heure : 0,72 μg en l'absence de sérum et 0,47 μg en présence de sérum. Le calcul du critère *t* de Student Fischer conduit à P très voisin de 0,01. On peut donc conclure que la présence de sérum frais dans le milieu d'incubation diminue l'intensité de la glycogénèse.

5° *Influence de l'insuline.* — Dans des conditions identiques, les leucocytes d'un même prélèvement ont été mis en incubation

TABLEAU III.

Teneur en Glycogène (μ g) de Granulocytes (10^6)			Glycogène (μ g) synthétisé en Ih. par 10^6 Granulocytes.	
Avant Incubation		Après Incubation		
Nos des Exp.		en milieu salin + Glucose	en milieu salin + Glucose et sérum	en milieu salin + Glucose et sérum
21	1,87	3,15	2,80	0,62
22	1,58	2,15	1,87	0,58
23	1,25	2,80	1,60	1,03
24	1,58	2,52	2,28	0,49
25	1,25	2,76	1,69	1,00
26	1,25	2,48	2,50	0,82
27	1,87	3	2,85	0,75
Moyennes	1,5	2,66 (+ 77%)	2,23 (+ 48,6%)	0,72 $\sigma = \pm 0,025$
				$\sigma = \pm 0,02$

TABLEAU IV.

Teneur en Glycogène (μ g) de Granulocytes (10^6)			Glycogène (μ g) synthétisé en Ih. par 10^6 Granulocytes.	
Avant Incubation		Après Incubation		
Nos des Exp.		en milieu glucosé	en milieu glucosé + insuline	en milieu glucosé + insuline
30	3,93	4,91	5,72	0,65
31	4,53	6	6,4	0,98
32	2,86	3,93	4,65	0,71
33	1,75	2,86	3,16	0,74
34	1,61	2,54	2,80	0,49
35	0,76	1,94	3,81	0,79
36	1,07	2,55	2,62	0,85
37	2,81	4,03	5,24	0,81
38	0,68	2,45	4	1,16
39	3,57	5,39	6,82	1,34
Moyennes	2,34	3,62	4,52	0,85 $\sigma = \pm 0,25$
				$\sigma = \pm 0,54$

dans le milieu salin glucosé habituel (formule paragraphe 1) additionné ou non de 1 unité d'insuline (2) par millilitre.

Le résultat des dosages de glycogène est donné dans le tableau IV. On constate que, dans tous les essais, le glycogène intraleucocytaire a augmenté avec une intensité plus grande dans le milieu chargé d'insuline. Quantité moyenne de glycogène synthétisé en une heure : 0,85 μ g en l'absence d'insuline ; 1,45 μ g en présence d'insuline.

Le critère t de Student Fischer est de $P = 0,01$.

On est donc en droit de dire que l'insuline, ajoutée *in vitro* au milieu de suspension, augmente la glycogénèse leucocytaire.

DISCUSSION.

Comme on le sait, et comme nous avons eu nous-mêmes l'occasion de le noter [8, 9, 10, 12], la teneur en glycogène des leucocytes est variable. Est-il possible d'étudier *in vitro* ces variations ? Aisément, quand il s'agit d'une glycogénolyse, beaucoup moins facilement s'il s'agit d'une glycogénèse.

Néanmoins, on peut ajouter que, dans ce dernier cas, l'opération est parfaitement réalisable *in vitro* pour peu qu'on ait pris soin de se placer dans de bonnes conditions expérimentales. A notre avis, des conditions essentielles sont les suivantes :

1° *Choix des leucocytes*. — Tous les leucocytes ne se prêtent pas aussi bien à l'expérience. Ainsi, il vaut mieux rejeter, en dépit de la facilité de leur obtention, les leucocytes inflammatoires parce que, normalement, ceux-ci ont déjà une teneur très élevée en glycogène. En revanche, on peut dire que les globules blancs du sang de cheval se prêtent parfaitement à l'observation d'une glycogénèse, car ils contiennent normalement peu de glycogène. Autres avantages : on peut les obtenir en grand nombre et ils sont faciles à séparer des autres éléments sanguins.

2° *Conservation des leucocytes*. — Il faut conserver les leucocytes dans un milieu et dans des conditions telles que leur vitalité se trouve parfaitement respectée. Deux ordres de facteurs ont ici une importance prééminente : le milieu où baignent les cellules doit contenir des ions variés, en proportions définies ; il doit être aussi agité pour que le liquide soit sans cesse renouvelé sur la surface cellulaire, mais cette agitation doit rester modérée. Hempling [15] a, en effet, montré qu'une agitation trop violente ou trop longue dans l'appareil de Warburg finit toujours par altérer gravement les polynucléaires.

3° *Durée des expériences*. — Elle a été d'une heure trente dans nos expériences. Elle doit toujours être brève. Ceci n'offre

(2) L'insuline nous avait été obligeamment fournie par le laboratoire de l'Endopancrine.

aucun inconvénient quand se trouvent en cause des cellules au métabolisme très actif, ce qui est le cas des leucocytes du sang. On obtient alors des résultats qui sont beaucoup plus constants que ceux recueillis au cours d'expériences de plus longue durée. Celles-ci étant toujours accompagnées, en dernière analyse, de lésions cellulaires graves.

En tenant compte fidèlement des conditions ci-dessus, nous avons pu observer régulièrement une synthèse du glycogène par les polynucléaires. Nous sommes donc en mesure de confirmer les premiers résultats de Willstätter et Rohdewald [4]. A notre avis, l'échec de R. Wagner [4] tient aux conditions de survie défectueuses dans lesquelles étaient placées les cellules de cet auteur.

Cependant, Willstätter et Rohdewald n'avaient pas insisté sur l'importance du milieu de suspension. Il y avait là une lacune sérieuse que nous nous sommes efforcés de combler. De la sorte, nous avons été conduits à mettre au point un milieu standard, particulièrement convenable pour la mise en évidence d'une glycogénèse *in vitro*. Ce milieu doit obligatoirement contenir du *glucose*.

Toutefois, la teneur en glucose demeurant inchangée, la glycogénèse peut varier en fonction de la nature et de la concentration des autres facteurs également présents dans le milieu. Elle peut être diminuée ou augmentée.

1° *Elle est diminuée* par exemple quand, dans ce milieu, se trouve du *sérum de cheval frais* (nous rappelons que nos expériences portaient sur des polynucléaires isolés du sang de cheval).

Une telle action inhibitrice, au premier abord, surprend un peu. Nul n'ignore que les leucocytes se conservent beaucoup mieux dans un milieu qui contient des protéines homologues que dans un milieu simplement salin. On aurait donc pu prévoir que, dans le premier de ces milieux, l'activité métabolique serait plus intense et que la synthèse du glycogène par les cellules serait plus forte. Or, nous l'avons vu, il n'en est rien.

A la réflexion, cependant, on finit par trouver à ce phénomène une explication. On sait que certains facteurs sériques sont des inhibiteurs d'enzymes. En particulier, Bornstein et Park [46] ont pu isoler, des β -lipoprotéines sériques provenant d'animaux diabétiques, un inhibiteur de l'hexokinase musculaire. N'existerait-il pas également, dans le sérum, un inhibiteur de l'hexokinase leucocytaire capable de diminuer l'absorption du glucose ? Admettons que cette hypothèse soit exacte. Du même coup, on comprendrait, au moins dans une certaine mesure, pourquoi les leucocytes du sang renferment toujours moins de glycogène que les leucocytes inflammatoires.

Rappelons, par ailleurs, que l'un de nous a montré avec J. Pagès [17] que le sérum augmente la consommation d'oxygène des leucocytes. Sans doute est-il permis de penser que l'augmentation en cause s'accompagne d'un accroissement de la glycolyse, ce qui entraîne la dégradation d'une partie du glycogène néoformé. De nouvelles recherches, cependant, apparaissent nécessaires pour préciser la manière dont s'enchaînent les différentes réactions.

2° *Facteurs capables d'augmenter la glycogénèse leucocytaire.* Le plus important, selon nous, est représenté par les ions K^+ . Le rôle de ces ions, dans le cas présent, paraît double. D'une part, ils doivent maintenir l'équilibre ionique intracellulaire (comme l'ont montré Wilson et Manery [18], et Hempling [19]). De l'autre, ils doivent régler l'absorption du glucose puisque, selon les observations de Pulver et Verzar [20], glucose et ions K^+ disparaissent parallèlement du milieu. Cependant, alors que le glucose subit une série de transformations intracellulaires, le potassium est progressivement rejeté par les leucocytes. Vis-à-vis des ions K^+ , les polynucléaires semblent se comporter comme le tissu hépatique. Hastings et ses collaborateurs ont montré [21, 22] que pour celui-ci, et contrairement à ce qu'on observe dans le cas du tissu musculaire, les ions K^+ favorisent la glycogénèse *in vitro*.

Cas de l'insuline. L'action favorisante qu'elle exerce ici rappelle tout ce qu'on sait du rôle de cette hormone. Ajoutons que nos résultats s'accordent parfaitement avec l'observation récente de Haugaard et Stadie [23] selon laquelle les leucocytes comptent, dans l'organisme, parmi les cellules les plus aptes à fixer l'insuline; cette fixation serait bien un processus actif lié au métabolisme (3).

RÉSUMÉ.

1° Les polynucléaires isolés du sang de cheval sont parfaitement capables, *in vitro*, de synthétiser du glycogène.

2° La mise en place d'une glycogénèse, de même que l'intensité de celle-ci, dépendent de la constitution du milieu où baignent les cellules.

3° La présence du glucose dans ce milieu apparaît, d'après nos expériences au moins, indispensable. Ainsi, dans le milieu salin utilisé par nous, la présence de glucose a permis une synthèse de 0,73 μg de glycogène intracellulaire, en une heure, pour 10⁶ polynucléaires. Au contraire, en l'absence de glucose, nous

(3) Nous remercions M^{lles} M. Henrion et E. Rieuf, aides techniques, du concours précieux qu'elles nous ont apporté pour l'exécution de ce travail.

avons constaté dans les mêmes conditions une *perte* de 0,70 μg de glycogène intracellulaire.

4° Ajoutées au milieu glucosé standard, certaines substances peuvent modifier l'intensité de la glycogenèse. Il s'agit parfois d'une *action inhibitrice* (sérum frais homologue), parfois d'une *action favorisante* (ions K^+ et insuline).

SUMMARY.

Polynuclears isolated from horse serum are perfectly able to synthesise glycogen *in vitro*.

Synthesis of glycogen and its rate depend on the composition of the medium in which the cells are suspended.

The authors' experiments seem to indicate the presence of glucose in the medium to be indispensable.

When the saline medium indicated by the authors contains glucose, intracellular synthesis of 0.73 μg glycogen is stated in one hour in the presence of 10^6 polynuclears. In the absence of glucose a loss of 0.70 μg intracellular glucose is observed.

Certain substances can modify the rate of glycogen synthesis, either by inhibition (presence of fresh homologous serum) or by activation (presence of K^+ ions or of insulin in the medium).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. WILLSTATTER et M. ROHDEWALD. *Z. physiol. Chem.*, 1937, **247**, 127.
- [2] M. ROHDEWALD. *Bioch. Z.*, 1952, **323**, 146.
- [3] R. WAGNER. *Arch. Bioch.*, 1950, **26**, 123 et **29**, 260.
- [4] R. WAGNER et A. YOURKE. *Arch. Bioch.*, 1952, **39**, 174 ; 1953, **44**, 415.
- [5] G. R. MC KINNEY, S. P. MARTIN, R. W. RUNDLESS et R. GREEN. *J. appl. Physiol.*, 1953, **5**, 335.
- [6] S. N. BECK. *J. biol. Chem.*, 1955, **216**, 333.
- [7] F. MEYER. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 730.
- [8] R. ROBINEAUX, S. BAZIN et A. DELAUNAY. *C. R. III^e Congr. Soc. Int. Europ. Hémat. Rome*, 1951, 123.
- [9] R. ROBINEAUX, S. BAZIN, F. DELBARRE et A. DELAUNAY. *Le Sang*, 1951, **22**, 518.
- [10] S. BAZIN, R. ROBINEAUX et A. DELAUNAY. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 1855.
- [11] S. BAZIN et A. AVICE. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1025.
- [12] S. BAZIN, A. DELAUNAY et C. AVICE. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 1.
- [13] C. AVICE et S. BAZIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1023.
- [14] A. DELAUNAY. *Ann. Inst. Pasteur*, 1944, **70**, 372.
- [15] H. G. HEMPLING. *J. Cell. comp. Physiol.*, 1952, **40**, 161.
- [16] J. BORNSTEIN et C. R. PARK. *J. biol. Chem.*, 1953, **205**, 503 et 513.

- [17] A. DELAUNAY, J. PAGES et M. MAURIN. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, 72, 946.
- [18] D. L. WILSON et J. F. MANERY. *J. Cell. comp. Physiol.*, 1949, 34, 493.
- [19] H. G. HEMPLING. *J. Cell. comp. Physiol.*, 1954, 44, 87.
- [20] R. PULVER et F. VERZAR. *Helv. Chim. Acta*, 1941, 24, 272.
- [21] A. B. HASTINGS et J. M. BUCHANAN. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1942, 28, 478.
- [22] A. B. HASTINGS, C. T. TENG, F. B. NESBETT et F. M. SINEX. *J. biol. Chem.*, 1952, 194, 69.
- [23] N. HAUGAARD, E. S. HAUGAARD et W. C. STADIE. *J. biol. Chem.*, 1954, 211, 284.

ÉTUDE DES EFFETS HUMORAUX DE L'ADRÉNALINE (*).

par H. GLEYE et G. SANDOR.

(Institut Pasteur)

Certains des faits rapportés dans cette publication ont été brièvement résumés dans deux notes à l'Académie des Sciences [1, 2].

Le syndrome humoral de diminution du rapport : albumine/globulines, et d'augmentation du taux des α -globulines est des plus communs. On a pu penser que l'homéostasie de Cannon et, plus particulièrement, le jeu hypophyso-surrénal pourrait y contribuer, puisque très souvent ce syndrome est lié à une atteinte grave et brutale de l'état général (période d'invasion des maladies infectieuses graves, traumatisme, infarctus du myocarde, etc.). Pourtant, les corticostéroïdes et l'ACTH ne le provoquent nullement, au moins à échéance brève. Il est curieux de constater alors qu'aucune étude sérieuse ne fut consacrée dans ce sens à l'adrénaline. Nous n'avons pu relever dans toute la littérature scientifique que deux notes brèves, la première relatant incidemment que le taux de l'hexosamine sérique augmente sous l'effet de l'adrénaline chez le rat [3] et la deuxième rapportant que les diagrammes obtenus par l'électrophorèse sur papier ne sont pas modifiés sous l'effet de la noradrénaline chez le rat [4]. Or, l'adrénaline possède une position-clé dans l'homéostasie de Cannon [5, 6]. Aussi, une étude sérieuse de ses effets humoraux s'est imposée à nous (1).

DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES.

TECHNIQUES : Nous utilisons uniquement des cobayes qui semblent particulièrement sensibles aux modifications humorales de ce genre. Les animaux sont adultes et de sexe masculin. Les injections sont en règle générale intrapéritonéales et les prises de

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} mars 1956.

(1) Le chlorhydrate d'adrénaline utilisé dans nos expériences a été fourni gracieusement par les Laboratoires Clin-Comar. Nous tenons à les remercier vivement.

sang intracardiaques. On laisse coaguler le sang à la température du laboratoire et le sérum est prélevé au bout de vingt-quatre heures par centrifugation.

L'électrophorèse libre est effectuée au centre d'électrophorèse du C. N. R. S., à pH 8,6, dans un tampon de véronal-véronal de sodium M/10 contre lequel le sérum a été dialysé au préalable : celui-ci est dilué au tiers. L'électrophorèse est continuée à peu près pendant trois heures avec un gradient de 10 v/cm environ. L'électrophorèse sur papier est pratiquée par une technique que nous avons décrite ailleurs [7].

Pour dresser les diagrammes de précipitation en fonction du pH en présence de forces ioniques réduites (fiche réticulo-endothéliale) nous avons utilisé pour la présente étude un tampon universel préconisé par Longworth [8]. On dissout dans l'eau 2 g de chacun des trois sels : cacodylate de sodium, acétate de sodium et véronal sodé, on ajoute 6,7 ml d'acide chlorhydrique normal et on complète à 1 l. La solution est diluée au 1/10 avant l'emploi. 1,5 ml de sérum sont dilués à 125 ml avec la solution tampon, puis on répartit dans 12 fioles numérotées de 1 à 12, 5 ml dans la première et 10 ml dans les onze autres. On ajoute tout d'abord les volumes suivants d'eau distillée :

N° DES FIOLES											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	1,78	1,58	1,4	1,24	1,08	0,92	0,76	0,6	0,44	0,28	0,08

enfin, lentement en agitant les volumes suivants d'acide chlorhydrique N/75 :

N° DES FIOLES											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0,22	0,42	0,60	0,76	0,92	1,08	1,24	1,40	1,56	1,72	1,92

Les opacités sont lues immédiatement à 430 millimicrons et exprimées en p. 100 de la transmission. Après réduction proportionnelle à la hauteur du standard, les diagrammes sont interprétés dans les conditions habituelles. Rappelons qu'un déplacement vers la région alcaline signifie augmentation du rapport γ -globulines/globulines totales, alors qu'à un déplacement vers la région acide correspond une augmentation du rapport α -globulines/globulines totales [11].

Les taux de l'albumine, des globulines et leur rapport sont déterminés par la méthode de Pillemer et Hutchinson [9], la seule capable de donner ce rapport correctement dans les états pathologiques.

Les glucides liés aux protéides sont dosés selon Soerensen et

Haugaard [40] dans le sérum dialysé. Cette technique n'est pas tout à fait correcte, mais nous avons admis que la faible proportion du glucose non dialysable n'interfère pas avec les résultats.

L'extrait lipoidique est déterminé par une technique couramment utilisée dans ce laboratoire. Quatre ml (2) de sérum sont desséchés dans le vide sulfurique, puis maintenus à 60° pendant deux heures en présence d'un mélange de 3 volumes d'alcool à 95 p. 100 et 1 volume d'éther anhydre. Le mélange est transvasé dans un entonnoir à décanter et la fiole rincée avec trois fois 2 ml d'éther de pétrole rectifié, anhydre. Le rinçage est transvasé dans l'entonnoir à décanter. On ajoute encore 2 ml d'éther de pétrole, puis on lave une fois avec 10 ml d'acide chlorhydrique N/10 et deux fois avec 2 ml d'eau distillée. L'éther de pétrole est transvasé dans une fiole tarée, puis évaporé sous un courant d'azote.

RÉSULTATS.

RAPPORT : ALBUMINE/GLOBULINE.

Lors de nos très nombreuses études nous avons pu déterminer les valeurs physiologiques avec une grande exactitude. Comme ces valeurs, selon la méthode de Pillemer et Hutchinson, n'ont pas encore été publiées à notre connaissance, nous les donnons ci-après :

NOMBRE de cobayes	A/G	NOMBRE de cobayes	A p. 100	NOMBRE de cobayes	G p. 100
126	1,22	97	3,02	66	2,53

Il s'agit de moyennes arithmétiques. Le rapport : A/G, paraît être relativement stable puisque pour des lots partiels d'une quarantaine de cobayes il n'a varié qu'entre 1,2 et 1,24. Le taux des globulines, de son côté, paraît être plus stable que celui de l'albumine.

Des essais préliminaires nous ont prouvé que, d'une part, l'injection de l'eau physiologique modifie à elle seule le rapport A/G et, d'autre part, l'influence de l'adrénaline passe pour un maximum quarante-huit heures après son administration. Aussi, deux sortes d'expériences cruciales ont été établies.

1° Un seul traitement par l'adrénaline :

On prend un lot de 20 cobayes. 10 reçoivent par la voie péritonéale 1/2 mg de chlorhydrate d'adrénaline dissous dans 5 ml d'eau physiologique en plusieurs doses réparties dans la journée, et les dix autres reçoivent, dans les mêmes conditions, exactement

(2) Habituellement nous utilisons 2 ml de sérum ; mais le sérum du cobaye est tellement pauvre en lipides qu'il en faut au minimum 4 ml.

5 ml d'eau physiologique. Le sang est pris quarante-huit heures après. Les résultats obtenus sont les suivants :

	ALBUMINES p. 100	GLOBULINES p. 100	A/G
Eau physiologique	2,93	2,42	1,22
Adrénaline.	2,45	2,55	0,96

Il s'agit de taux moyens exprimés en grammes p. 100 de sérum.

La diminution du taux de l'albumine sous l'effet de l'adrénaline est indiscutable. D'ailleurs, elle existe non seulement pour la moyenne, mais aussi individuellement, puisque le taux sérique de l'albumine est resté inférieur à 2,9 p. 100 chez tous les cobayes traités par l'adrénaline.

2° Trois traitements à quarante-huit heures d'intervalle (3).

Il s'agit de la méthode de choix que nous avons adoptée, en principe, pour tous les essais ultérieurs. En règle générale, nous prenons un lot de 12 cobayes. On prélève du sang par ponction cardiaque pour déterminer les compositions avant tout traitement. Le jour même, 6 sont traités par l'adrénaline et 6 autres par l'eau physiologique, exactement comme il est indiqué ci-dessus. Les mêmes traitements sont répétés encore deux fois à quarante-huit heures d'intervalle, enfin, quarante-huit heures après le dernier traitement, le sang est prélevé à nouveau pour déterminer l'influence du traitement sur ses constituants. Nous reproduisons quelques-uns des résultats obtenus :

	1 ^{er} LOT A/G	2 ^e LOT A/G	3 ^e LOT A/G	4 ^e LOT A/G	MOYENNE des 4 lots
Avant	1,13	1,36	1,06	0,85	1,10
Eau physiologique. . .	0,84	1,04	0,92	0,78	0,89
Adrénaline.	0,60	0,89	0,59	0,56	0,60

Le traitement par l'eau physiologique exerce déjà une influence indiscutable, mais l'adrénaline renforce considérablement celle-ci. Cette conclusion est manifeste non seulement pour la moyenne des 4 lots, mais encore pour chaque lot individuel. Remarquons que si, comme il fallait s'y attendre, la diminution du rapport A/G est, présentement, bien plus marquée que dans l'essai ci-dessus, la différence est due surtout au fait que le taux des globulines, sensiblement inchangé après un seul traitement, augmente notablement par actions itératives. En effet, pour 24 cobayes traités nous relevons en moyenne les compositions suivantes : Albumine, 2,37 p. 100 ; Globulines, 2,9 p. 100.

(3) Parfois nous avons opéré tous les jours au lieu de tous les deux jours et les résultats sont comparables.

MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION DES GLOBULINES : L'électrophorèse sur papier indique nettement un pâlisement de la tache de l'albumine, mais ne donne aucun renseignement valable concernant les globulines. Remarquons que nous l'utilisons uniquement d'une manière qualitative.

L'électrophorèse libre a été pratiquée trois fois sur des mélanges de sérums de cobayes traités à trois reprises comme il a été indiqué ci-dessus. A chaque fois il s'agit d'un lot de 12 cobayes dont 6 traités par l'eau physiologique et 6 par l'adrénaline. Le sang est prélevé avant la première injection d'adrénaline et vingt-quatre heures après la dernière. Les résultats sont réunis dans le tableau I.

TABLEAU I. — Influence de l'adrénaline sur la composition électrophorétique du sérum de cobaye.

	albumine p.100	alpha-glo- bulines p.100	A/G	alpha/A
I) avant	51,3	27,9	1,05	0,54
eau phys.	48,4	31,4	0,94	0,65
adrénaline	44,1	35,3	0,79	0,80
II) avant	52,2	22,3	1,09	0,43
eau phys.	51,5	28,5	1,06	0,55
adrénaline	51,5	24,3	1,06	0,47
III) avant	49,4	28,6	0,97	0,58
eau phys.	50,9	28,8	1,04	0,57
adrénaline	46,3	32,6	0,86	0,70

Dans deux des trois expériences le taux des α -globulines augmente sous l'effet de l'adrénaline, faiblement, mais d'une manière indiscutable et celui de l'albumine baisse de façon significative. La troisième expérience est complètement négative. Le traitement par l'eau physiologique ne semble exercer d'effet notable qu'une fois sur les trois expériences et même alors l'adrénaline le renforce sensiblement.

De très nombreux essais, s'étendant sur 150 cobayes environ, ont été effectués à l'aide de la fiche réticulo-endothéliale. Sur 64 cobayes normaux le standard a été tracé dans les mêmes conditions que pour l'homme et le lapin [11, 12]. Ses caractéristiques sont les suivantes :

pH.	7,2	6,9	6,6	6,3	6	5,7	5,4	5,1	4,8
Lecture . . .	1,3	7	15	24	29,3	31	30	25,7	17,3

Les lectures indiquent les différences des absorptions néphélométriques p. 100 entre le sérum et le tampon. Elles sont toujours faites à 430 m μ avec filtre bleu [11].

Dans la figure 1 nous avons tracé comparativement les standards de l'homme [41], du lapin [42] et du cobaye. Rappelons que dans les mêmes conditions de dilution finale nous utilisons 1,5 ml des sérums de lapin et de cobaye contre 0,84 ml de

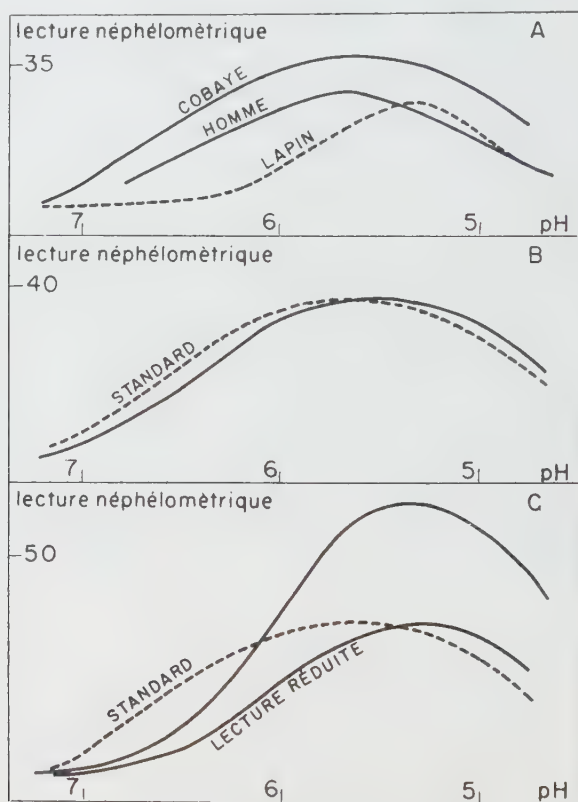


FIG. 1. — A, Comparaison entre les standards de l'homme, du lapin et du cobaye. B, Type de réaction faible. C, Type de réaction nette. Nous avons figuré les lectures néphélométriques directes à côté de celles réduites proportionnellement à la hauteur du standard ; les premières indiquent une forte augmentation du taux des euglobulines.

sérum humain. Ainsi, le taux des euglobulines dans le sérum du cobaye est, en réalité, légèrement inférieur à celui du sérum humain, en bon accord avec un taux de globulines totales inférieur également. L'allure des deux diagrammes est proche et s'écarte considérablement de celle du diagramme du lapin.

Sous l'effet de l'eau physiologique et de l'adrénaline les diagrammes se déplacent vers la région acide dans un certain nombre de cas. Nous avons classé les modifications en faibles et nettes suivant les deux figures (fig. 1 B et C) prises au hasard parmi les diagrammes modifiés. Nous voyons que, lors des réactions nettes, les diagrammes non seulement se déplacent proportionnellement vers la région acide, mais encore, en règle tout à fait générale, le taux des euglobulines augmente considérablement, dépassant deux à trois fois son taux initial.

L'ensemble des résultats ainsi classés est réuni dans le tableau II. Un certain nombre de cobayes, nous le voyons, fut soumis à un jeûne de quarante-huit heures. Ceci pour éliminer l'influence éventuelle de l'état post-prandial, le cobaye, animal herbivore, étant, en fait, toujours dans cet état. Sous la rubrique : saignée, nous réunissons des animaux à qui on a prélevé par ponction cardiaque une seule fois 3 à 4 ml de sang, comme nous le faisons lors de l'étude de l'influence de l'adrénaline. Les animaux étaient traités par l'eau physiologique, comme par l'adrénaline dans les conditions indiquées ci-dessus (trois séries d'injections à vingt-quatre ou quarante-huit heures d'intervalle, saignée avant la première injection et quarante-huit heures après la dernière).

Aucun des animaux soumis au jeûne ne présente de réaction

TABLEAU II. — Influence de l'adrénaline
sur la fiche réticulo-endothéliale du cobaye.

	NOMBRE DE COBAYES	NEGATIFS	FAIBLEMENT POSITIFS	NETTEMENT POSITIFS
Jeune	9	67%	33%	0
saignée	23	78"	5%	17%
Eau phys.	51	37"	45"	18"
belle saison	26	62"	23"	15"
mauvaise sais.	25	12"	54"	24"
adrénaline	59	24"	10"	66"
belle saison	31	45"	19"	36"
mauvaise sais.	28	0	0	100"

nette, mais la saignée relativement très peu abondante suffit pour en provoquer chez 17 p. 100 des animaux, très probablement en raison du stress émotionnel que comporte la manipulation. Les animaux traités par l'eau physiologique, témoins à proprement parler de ceux traités par l'adrénaline, répondent, surtout, par des réactions faibles, et l'influence saisonnière est manifeste, puisque 12 p. 100 seulement des animaux ne réagissent pas du tout pendant l'hiver contre 61,5 p. 100 pendant la belle saison.

Des réactions nettes ne s'observent pratiquement que sous l'effet de l'adrénaline, mais 36 p. 100 seulement des animaux les présentent pendant la belle saison, alors que tous sans exception les produisent pendant l'hiver.

Nous reproduisons les résultats de trois de nos expériences concernant l'influence de l'adrénaline sur le taux des glucides liés aux protéides. Un lot de 12 cobayes a servi à chacune d'elles, dont 6 ont reçu des injections d'eau physiologique seule et 6 autres d'eau physiologique contenant de l'adrénaline. Toujours il s'agit de trois séries d'injections à quarante-huit heures d'intervalle, une première prise de sang étant faite avant la première injection et une deuxième quarante-huit heures après la dernière. Les déterminations sont faites sur des mélanges de sérum (voir tableau III) :

TABLEAU III. — Influence
de l'adrénaline sur les gluco-protéines sériques.

	glucides p.1000 de sérum:	glucides p.100 de globulines:
I) avant	1,09	5,1
eau physiologique	0,91	4,5
adrénaline	1,28	4,5
II) avant	1,38	6,6
eau physiologique	1,34	5,6
adrénaline	1,55	6,4
III) avant	1,15	4,1
eau physiologique	1,38	5
adrénaline	1,54	4,7

Dans la première colonne figurent les taux exprimés en grammes p. 1 000 de sérum. Ils prouvent qu'alors que l'eau physiologique ne semble pas exercer d'influence, sous l'effet de l'adrénaline le taux des glucoprotéides remonte sensiblement. Dans la deuxième colonne nous avons rapporté les taux glucidiques trouvés à ceux des globulines. En effet, nous savons que, pratiquement, ces dernières seules supportent des glucides en proportion notable [13]. Or, les globulines ne semblent pas s'enrichir en glucides ce qui prouve que les α -globulines sécrétées sous l'effet de l'adrénaline ne sont pas particulièrement riches en glucides. Fait assez contradictoire puisque, d'une part, tous les glucoprotéides à proprement parler sont des α -globulines et, d'autre part, la grande majorité des α -globulines est très riche en glucides.

Mentionnons, enfin, que le taux des lipides totaux, d'ailleurs très faible dans le sérum de cobaye (0,5 p. 1 000) ne semble pas se modifier sous l'effet de l'adrénaline.

DISCUSSION.

L'adrénaline reproduit donc, dans certaines conditions, le syndrome clinique si commun de diminution du rapport A/G et l'augmentation du taux sérique des α -globulines. Logiquement, nous attribuons cette influence à l'action de l'adrénaline sur le métabolisme cellulaire général. Dès 1930, Cori et Cori [14] remarquent que le seuil de l'action glycogénolytique de l'adrénaline est bien inférieur à celui de son effet hypertensif et, d'une revue d'ensemble de la question, Beyer [15] conclut que l'action hypertensive elle-même pourrait n'être qu'une conséquence de l'augmentation de l'intensité du métabolisme cellulaire. Effectivement, Rothlin et Cerletti [16] trouvent qu'à taux relativement faible l'adrénaline augmente considérablement le métabolisme basal des animaux. Rappelons que l'hypothèse de la médiation du jeu hypophyse-surrénale par l'adrénaline se fonde aussi sur son effet métabolisant. Long [5] admet, en effet, qu'il en est ainsi parce que l'adrénaline augmente la consommation tissulaire des corticostéroïdes. De ce fait leur taux sanguin baisserait et la sécrétion de l'ACTH est déclenchée d'une manière homéostatique.

L'influence saisonnière plaide, de son côté, aussi en faveur de l'existence d'une relation entre l'intensité du métabolisme cellulaire et, en particulier, le taux sanguin des α -globulines, puisque l'adrénaline agit pendant l'hiver sur un métabolisme cellulaire déjà plus intense du fait du froid.

Et la vue que nous avons ainsi de la physiopathologie des hyper- α -globulinémies est bien cohérente. Depuis que Gersh et Catchpole [17] ont développé l'hypothèse de l'état dynamique de la substance fondamentale conjonctive, beaucoup ont pensé que l'augmentation du taux sanguin des α -globulines résulte de sa résorption dans le courant circulatoire [18, 19]. Pourtant, cette hypothèse n'est même pas plausible sur le plan chimique. En effet, si la substance fondamentale conjonctive, pour ce que nous en savons, est composée de restes d'acides uroniques et d'esters sulfuriques, le composant glucidique des glucoprotéides sériques est un polymère d'un galactose-mannose-osamine [26]. D'autre part, l'hyper- α -globulinémie ne s'observe pas seulement dans les grandes phlegmasies toxi-infectieuses et dans les traumatismes où, à la rigueur, nous pourrions parler d'une désagrégation du tissu conjonctif ; on la retrouve encore dans les cancers évolutifs [20, 21], dans les derniers mois de la grossesse [22] et chez le fœtus [23, 24, 25]. Or, un appel intense de métabolites par les tissus est commun à tous ces états. Il est fait soit pour remédier au bilan azoté négatif des états fébriles et des chocs traumatiques [27], soit pour synthétiser des tissus à développement rapide (cancer, grossesse, état fœtal). Alors, les α -globulines

pourraient intervenir comme des transporteurs, suivant l'idée que Bennhold [28] a émise autrefois et à laquelle revient, plus récemment, Grabar [29]. Soit par leurs affinités spécifiques, soit par leur effet solvant, les α -globulines s'emparent de pigments, de métaux, d'hormones ou de métabolites pour les transporter aux lieux cellulaires de la synthèse.

La diminution du taux de l'albumine pourrait s'interpréter de deux manières. Tout d'abord, l'albumine pourrait intervenir comme source de métabolites azotés dans les tissus, ce contre quoi plaide sa « durée de vie » relativement très longue (voir par exemple [30, 31]). D'autre part, on pourrait admettre que l'albumine et les α -globulines sont synthétisées par les mêmes cellules qui fabriquent moins de la première lorsqu'elles sont engagées plus intensément dans la synthèse des secondes [32].

RÉSUMÉ.

Sous l'effet de l'adrénaline le rapport albumine/globuline diminue et les taux des α -globulines et des glucoprotéides augmentent chez le cobaye. Ces modifications sont provoquées plus régulièrement pendant l'hiver que pendant la belle saison. On admet qu'il s'agit d'une conséquence de l'action activante de l'adrénaline sur le métabolisme cellulaire et une théorie des hyper- α -globulinémies cliniques est développée sur cette base.

SUMMARY.

The ratio albumine/globuline decreases in the guinea-pig after injection of adrenaline, while the levels of α -globulines and of glucoproteins increase. These modifications are produced more regularly during the winter than during the summer months. It is supposed that these effects are due to an activating action of adrenaline upon cellular metabolism, and a theory of the clinical hyper- α -globulinemias is developed upon this basis.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GLEYE (M.) et SANDOR (G.). *R. C. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 1716.
- [2] GLEYE (M.) et SANDOR (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 948.
- [3] BOAS (N. F.) et PETERMAN (A. F.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **82**, 19.
- [4] HOCH-LIGETI (C.) et IRVINE (K.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **87**, 324.
- [5] LONG (C. N. H.). *Feder. Proceed.*, 1947, **6**, 2.
- [6] DAUGHERTY (T. D.). *Physiol. Rev.*, 1952, **32**, 379.
- [7] SANDOR (G.) et SABETAY (Y.). *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1954, **36**, 613.

- [8] LONGSWORTH (L. G.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1941, **41**, 267.
- [9] PULLEMER (L.) et HUTCHINSON (M. C.). *J. biol. Chem.*, 1945, **158**, 299.
- [10] SOERENSEN (M.) et HAUGAARD (C.). *Biochem. Z.*, 1933, **260**, 247.
- [11] SANDOR (G.), LAGRUE (G.), LE BOT (Y.) et SABETAY (Y.). *Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 646.
- [12] GLEYE (M.), SANDOR (G.) et LEVADITI (J.). *Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 299.
- [13] BLIX (G.), TISÉLIUS (A.) et SVENSSON (H.). *J. biol. Chem.*, 1941, **137**, 485.
- [14] CORI (C. F.) et CORI (G. T.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1930, **27**, 560.
- [15] BEYER (K. H.). *Physiolog. Rev.*, 1946, **26**, 169.
- [16] ROTHLIN (E.) et CERLETTI (A.). *Helvetica Physiol. et Pharmacol. Acta*, 1952, **106**, C. 24.
- [17] GERSH (I.) et CATCHPOLE (H. R.). *Amer. J. Anatomy*, 1949, **85**, 457.
- [18] JAYLE (M. F.) et BOUSSIER (G.). *Presse médicale*, 1954, **62**, 1752.
- [19] ROMANI (D.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1970.
- [20] SEIBERT (F. B.), SEIBERT (M. V.), ATNO (A. J.) et CAMPBELL (H. W.). *J. clin. Invest.*, 1946, **26**, 90.
- [21] JUSTIN-BESANÇON (L.), LAMOTTE (M.), LAMOTTE-BARILLON (S.), BEAULIEU (E.) et BOUSSIER (G.). *Semaine Hôp.*, 1955, **31**, R. M. 61.
- [22] LONGSWORTH (L. G.), CURTIS (R. M.) et PEMBROKE (R. H.) JR. *J. Clin. Invest.*, 1945, **24**, 46.
- [23] JAMESON (E.), ALVAREZ-TOSTADO (C.) et SARTOR (H. H.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1942, **51**, 163.
- [24] MOORE (D. H.), SHEN (S. C.) et ALEXANDER (C. S.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1945, **58**, 307.
- [25] MARTIN (N. H.). *Lancet*, 1954, **2**, 1094.
- [26] RIMINGTON (C.). *Biochem. J.*, 1929, **23**, 430 ; 1940, **34**, 931.
- [27] POLLACK (H.) et HALPERN (S. L.). *Adv. Prot. Chem.*, 1951, **6**, 383.
- [28] BENNHOLD (H.). *Verh. deutschen Gesell. inn. Med.*, XLII^e Congrès, Wiesbaden, 1930.
- [29] GRABAR (P.). *Les globulines du sérum sanguin*. Desoer, édit., Liège, 1947.
- [30] ARMSTRONG (S. H.), KUKRAL (J.), McLEOD (K.), WOLTER (J.) et BRONSKY (D.). *J. Labor. clin. Med.*, 1955, **45**, 51.
- [31] DIXON (F. J.). *J. Allergy*, 1954, **25**, 487.
- [32] SCHULTZ (J.), GRANNIS (G.), KIMMEL (H.) et SHAY (H.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **57**, 174.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 7 Juin 1956.

Présidence de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

NÉCROLOGIE

MAURICE JAVILLIER

(1875-1955)

Il y a aujourd'hui un an, le professeur Maurice Javillier nous quittait ; et si sa disparition laisse un vide sensible au sein de nombreuses académies, sociétés et commissions dont il était, à 80 ans, un membre éminent et actif, il reste toujours présent dans le cœur de ses proches, de ses amis et de ses élèves qui ne l'oublient pas.

Depuis le début de sa carrière scientifique, où il fut élève d'Emile Duclaux, puis de Gabriel Bertrand, jusqu'à ses dernières années où il continuait encore à travailler rue du Docteur-Roux, Maurice Javillier est resté très attaché à l'Institut Pasteur et il fait vraiment partie de cette grande famille pastorienne.

Ses études de pharmacie et de sciences terminées, M. Javillier commença sa carrière universitaire à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Tours, où il fut chef de travaux, puis professeur de pharmacie et matière médicale (1900-1909). Sa thèse de sciences naturelles qu'il soutint en 1908 sur le rôle du zinc dans les plantes, et qu'il avait préparée sous la direction de Gabriel Bertrand, consacra sa maîtrise et reste un monument dans l'histoire de la biochimie. A la suite de son maître, il comprit l'importance capitale des oligoéléments, et ses travaux sur le zinc marquaient le début d'une vie de recherches dans les domaines si délicats de la biochimie des « infiniments petits chimiques » et de la chimie végétale et agricole.

Il occupa de 1909 à 1922 la situation de chef de travaux à la Faculté de Pharmacie de Paris, tout en travaillant comme assistant à l'Institut Pasteur. Cette époque fut marquée par un grand nombre de publications sur le dosage du zinc et sur le rôle indispensable de cet élément chez les champignons et les végétaux supérieurs. Pendant la guerre, M. Javillier eut d'importantes responsabilités et rendit de grands services techniques.

Nommé maître de conférences de chimie biologique à la Faculté des Sciences en 1919, il se trouve de nouveau attaché à l'Institut Pasteur où s'enseignait alors le certificat de chimie biologique. Il dirige d'autre part, pendant dix ans, le laboratoire de chimie physiologique du Centre de recherches sur l'alimentation. Il oriente alors ses recherches et celles de ses élèves vers l'étude de l'avitaminose A, du facteur vitaminique A, dont il pressent la relation structurale avec le phytol et surtout avec le carotène, dont il démontre l'activité vitaminique. Dans une tout autre direction il s'intéresse à la biochimie du phosphore, analyse les composés phosphorés des tissus et démontre l'importance du phosphore nucléique comme caractéristique tissulaire.

La succession de Schlœsing lui donne d'autre part, en 1931, une chaire au Conservatoire National des Arts et Métiers, où il enseignera la chimie agricole. Il rénovra totalement cet enseignement. « Biochimie et Agronomie : il est impossible de séparer ces deux mots », disait-il. Par l'étude des besoins en magnésium des végétaux supérieurs, par ses travaux sur d'autres oligoéléments, par ses recherches sur la biochimie des céréales, et tout spécialement du blé, M. Javillier a beaucoup contribué à développer cette science et a longuement lutté aux côtés de G. Bertrand pour faire comprendre l'importance capitale des engrais minéraux.

Ayant succédé en 1937 au professeur Gabriel Bertrand à la chaire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences, il la transférera de l'Institut Pasteur à la Sorbonne dans de nouveaux locaux qu'il aura la charge d'installer.

Qui a eu le bonheur d'entendre le cours du professeur M. Javillier ne peut oublier le charme de ce remarquable conférencier, la clarté de ses exposés magistraux, l'élégance de sa parole toujours précise, l'harmonie qui se dégageait de ses leçons bien construites et l'enthousiasme qu'il savait communiquer pour la chimie des êtres vivants.

Il dirige alors plusieurs laboratoires où ses élèves deviennent eux-mêmes des maîtres, et avec une rare discrétion, lui-même leur laisse de plus en plus, le bénéfice de la signature des publications. Avec J. Lavollay il continue à approfondir l'importance des oligoéléments chez les végétaux et aussi la biochimie des facteurs vitaminiques P. Avec P. Meunier et Y. Raoul, il pour-

suit l'étude de la vitamine A et de ses rapports avec d'autres vitamines. Il consacre d'autre part son activité à la rédaction de nombreux ouvrages, articles, conférences, ayant le souci constant de transmettre au maximum les fruits de sa pensée et la somme de ses connaissances afin d'instruire et de rendre service. La biochimie agricole le passionnait et, jusqu'à ses derniers instants, il pensait à répandre ses idées et à faire progresser la science dans les domaines divers de l'agronomie. Sa dernière œuvre est sans doute la mise en chantier d'un traité de Biochimie Générale, commencé avec son ami le professeur M. Polonovski, mon père, dont la mort l'avait douloureusement affecté.

Formé dès le début à une discipline microanalytique toute de précision, il apporta à tout ce qu'il faisait cette même rigueur et cette finesse méticuleuse. Mais ce sont sans doute ses qualités personnelles de probité, d'intransigeance, de sensibilité, d'ordre, de soin et de méthode, qui ont fait de lui un maître de cette délicate science des éléments biocatalytiques. Ses qualités, nous les retrouvons dans tout ce qu'il faisait. Loin de limiter son horizon aux seuls problèmes de l'enseignement et de la recherche, il avait un très grand souci de son engagement humain, de ses responsabilités sociales. Animé d'une foi profonde, réfléchie et intelligente, épris de justice et de paix, il ne pouvait pas se taire devant les malhonnêtetés politiques, les injustices sociales. Il soutenait tous les mouvements de paix, il s'exprimait très fermement aux congrès d'intellectuels, et tout particulièrement à la Semaine des intellectuels catholiques, à laquelle il participait régulièrement. Toujours simple et ouvert, il ne jugeait jamais avec parti pris, accordant toujours un préjugé favorable à son interlocuteur.

Commandeur de la Légion d'honneur, croix de guerre, commandeur de l'Ordre de la Santé publique, membre de l'Institut, de l'Académie de Médecine et de l'Académie d'Agriculture, membre correspondant de plusieurs académies étrangères, M. Javillier est mort au faite d'une vie bien remplie, entouré de ses enfants, petits-enfants et arrière-petits-enfants, et soutenu par M^{me} Javillier qui, par son appui constant, sa compréhension éclairée, son dynamisme et son dévouement affectueux, a amplement participé à toute son œuvre.

Sans doute doit-il beaucoup à l'Institut Pasteur et à ses maîtres en biochimie. Mais l'Institut Pasteur lui doit plus encore : une grande figure de savant qui honore la famille dont il n'a cessé de faire partie.

J. POLONOVSKI.

COMMUNICATIONS

COMPORTEMENT DE *PASTEURELLA PESTIS*

A L'ÉGARD DU RHAMNOSE

A PROPOS DE LA COMMUNICATION

DE E. R. BRYGOO ET J. COURDURIER (1)

par GEORGES GIRARD et ANDRÉ CHEVALIER.

(Institut Pasteur, Service de la Peste).

La fermentation du rhamnose par *Pasteurella pestis* est exceptionnelle, comme l'ont rappelé justement Brygoo et Courdurier. On sait, d'autre part, que l'acidification *rapide* des milieux liquides rhamnosés par *Past. pseudotuberculosis* est une règle qui ne connaît jusqu'à présent aucune exception ; aussi le test « rhamnose » est-il un des éléments de différenciation des deux germes qui possèdent par ailleurs de multiples affinités.

Dans des conditions précisées par nos deux collègues [1], un nombre important de souches de *P. pestis* leur est apparu comme acidifiant le rhamnose, et ils se sont demandé si ce caractère insolite était particulier aux souches malgaches, les seules dont ils disposaient à Tananarive. Ils soulignent que pour mettre en évidence cette acidification, il convient d'employer des milieux éminemment favorables à la croissance du bacille pesteux. Ils ont eu l'amabilité de nous faire parvenir quelques subcultures de leurs souches rhamnose +, ainsi qu'une copie de la note qu'ils adressaient à la Société de Microbiologie, ce dont nous les remercions. Nous leur avons aussitôt communiqué deux références dont ils ne pouvaient avoir eu connaissance, lesquelles sont de nature à modifier, sans toucher au fond, l'interprétation qu'ils assignent aux faits par eux constatés. La note ajoutée *in fine* à leur travail fait état de cette documentation complémentaire. C'est de celle-ci que nous nous inspirerons surtout pour faire une mise au point de cette question de la fermentation du rhamnose par le bacille pesteux, car elle revêt, outre son intérêt doctrinal, une portée pratique (1).

HISTORIQUE. — Lorsque A. Bezsonova fut conduite à préconiser un milieu liquide rhamnosé pour différencier *P. pestis* de *P. pseudotuberculosis*, elle savait déjà, comme en témoigne son mémoire original de 1929, que les deux microorganismes ne se comportaient pas identiquement vis-à-vis de ce glucide. Vourloude, dès 1908 [2], Swellen-

(1) Le lecteur se reportera à l'article de Brygoo et Courdurier pour les références bibliographiques des travaux dont ils font mention et que nous aurons à évoquer.

grebel et Hoosen en 1915 [3], avaient signalé ce contraste, mais ces auteurs limitèrent leurs investigations à quelques souches. Pour ce qui concerne *P. pestis* seule, Bezsonova se rapportait notamment aux travaux de R. d'Aunoy [4] dont le mémoire, qui date de 1923, représente la meilleure référence que nous possédons encore actuellement quant à l'action du bacille de Yersin sur les substances hydrocarbonées. Vingt-deux substances fermentescibles ont été étudiées par l'auteur sur 50 souches de peste d'origine humaine ou animale et de provenances diverses (Mandchourie, Inde, Etats-Unis, Philippines). Le milieu employé était une solution de peptone Difco à 1 p. 100, marque choisie à dessein « parce qu'elle ne contenait aucune fraction *carbohydrate like reacting* si souvent rencontrée dans d'autres peptones ». Le tableau qui synthétise les résultats montre qu'aucune des souches n'a fait fermenter le rhamnose. Par contre, d'Aunoy, dont le mémoire comporte un chapitre particulier sur l'action de *P. pestis* sur le glucose, souligne qu'avec ce glucide, le pH des 50 souches de peste passe parfois en vingt-quatre heures, et toujours en moins de quatre jours, de 6,6 à 4,8. Aussi, pour lui, le rhamnose fait partie des 14 substances fermentescibles qui, sur les 22 expérimentées, n'est pas attaquée par *P. pestis*. Cette absence de fermentation du rhamnose devait être confirmée par Bezsonova, puis par les auteurs cités par Brygoo et Courdurier. Cependant, des acidifications tardives étaient signalées, mais cette constatation était tenue pour pratiquement négligeable lorsqu'il s'agissait de discriminer *P. pestis* de *P. pseudotuberculosis* en suivant la technique recommandée pour l'exécution de la réaction. Le milieu de Bezsonova (0,5 g de peptone, 1 g de rhamnose, 0,5 g de NaCl p. 100) était assez peu favorable à la multiplication du bacille pesteux ; la croissance toujours plus rapide du bacille de Malassez, comparée à celle du bacille pesteux, quel que soit le milieu employé, et *a fortiori* sur un milieu pauvre, permettait en vingt-quatre ou quarante-huit heures de caractériser le premier. Nous avons nous-mêmes adopté cette formule, mais nous n'avons trouvé qu'avantage à porter à 1 p. 100 la dose de peptone et à remplacer la teinture de tournesol par un indicateur plus maniable et plus sensible, tel que le réactif d'Andrade. Ajoutons que nous utilisons des peptones éprouvées comme convenant à la croissance du bacille de la peste. Dans ces conditions, après trois jours d'incubation à 26-30° C, nous avons toujours confirmé la valeur de la réaction de Bezsonova pour distinguer les deux pasteurelles.

Brygoo et Courdurier, avec un milieu également très propice au développement de *P. pestis*, de larges ensemencements et le rouge de phényle comme indicateur, trouvent que 54 souches sur les 105 de leur collection ont au moins une fois (sur plusieurs essais) acidifié leur milieu liquide rhamnosé, après des délais variables ; de ces cultures, ils obtiennent des variants qui acidifient ensuite de façon régulière le milieu en quarante-huit heures. Sur les 7 variants reçus de nos collègues, nous avons pleinement confirmé ces résultats sur notre milieu habituel. Deux faits retiennent notre attention dans leur communication :

1° Une seule souche s'est manifestée d'emblée rhamnose + après deux à trois jours de culture (apparemment comme une souche de

P. pseudotuberculosis). Pour l'ensemble des autres, le virage de l'indicateur, au premier essai positif, ne s'est produit qu'après six jours ou plus.

2° Deux souches seulement, sur les 54 classées rhamnose +, ont fait fermenter ce glucide régulièrement, malgré des essais réitérés dans des conditions expérimentales identiques. Il s'agit donc, au départ, sauf pour une souche, d'acidifications tardives comme celles dont fait mention Pollitzer.

RECHERCHES DE E. ENGLSBERG. — En 1952, K. F. Meyer nous remettait une note dactylographiée de son collaborateur Ellis Englesberg, note restée inédite sous sa forme première et intitulée *Rhamnose utilisation by « P. pestis »*. Cet auteur discutait la valeur de la réaction de Bezsonova parce qu'il avait trouvé que les souches de *P. pestis*, considérées initialement comme rhamnoses négatives, étaient susceptibles, par culture sur un milieu d'Endo modifié, contenant du rhamnose comme unique élément hydrocarboné, de révéler l'existence de colonies rhamnose + apparaissant après un temps variant de six à quatorze jours. Ces « mutants », purifiés par repiquages sur milieu d'Endo rhamnosé, furent reportés sur gélose à l'hydrolysate de caséine glucosé sans que s'altérât leur pouvoir de décomposer le rhamnose dans la suite très rapidement. Englesberg a poursuivi cette étude et analysé l'aspect biochimique du processus après avoir résumé les faits consignés dans sa note préliminaire [5, 6]. Au point de vue qui nous préoccupe ici, notons que l'auteur souligne que l'oxydation du rhamnose par les mutants est incomplète ; elle contraste avec l'oxydation constante et totale du glucose par *P. pestis*.

INTERPRÉTATION ET DISCUSSION. — Il est assez inattendu que ce soit seulement sur un milieu d'Endo rhamnosé (à l'exclusion d'autres et en particulier du milieu EMB) que Englesberg ait détecté chez les 12 souches sur lesquelles ont porté ses investigations (6 virulentes et 6 non virulentes) quelques colonies rhamnose + au sein de la masse des colonies rhamnose —. Il semble, d'après la régularité de ces constatations, que toute souche de *P. pestis*, quelle que soit sa variété, est capable de donner naissance à des mutants rhamnose +. En effet, les 12 souches en question comportent les deux types continental et océanique. La souche EV (Girard et Robic), rhamnose négative pour Brygoo et Courdurier, a donné à Englesberg sur milieu d'Endo des mutants rhamnose + très apparents sur la photo que nous devons à l'amabilité de l'auteur. Ces mutants répondent bien à la définition des mutants spontanés qui n'affectent que de rares éléments de l'ensemble d'une culture, le taux de mutation de ceux-ci se situant généralement autour de 10^{-8} ou 10^{-9} . Il est dès lors concevable que de larges ensemencements sur milieu liquide (il y a plusieurs milliards de germes dans une forte anse de culture de peste prélevée sur gélose après trois ou quatre jours d'incubation) permettent à ces mutants d'apparaître, auquel cas le milieu vire, mais dans la majorité des cas, tardivement. C'est ce que nous avons constaté, à l'appui des recherches de Brygoo et Courdurier, en procédant aux larges ensemencements qu'ils préconisent, sur 77 souches de notre collection dont seulement

7 ont été isolées à Madagascar : 22 ont acidifié notre milieu habituel, avec le réactif d'Andrade comme indicateur, dans les délais suivants : 8 entre quatre et neuf jours, 9 entre dix et vingt jours, 5 entre vingt et trente jours. Parmi elles, on en compte appartenant au type océanique et aux deux variétés du type continental [7]. Mais il est incontestable que cette technique est très inférieure à celle d'Englesberg pour la détection des mutants, puisque nos collègues de Tananarive ne réussissent pas toujours à les mettre en évidence sur une même souche quand ils multiplient les essais en repartant de nouvelles cultures sur gélose.

REMARQUES. — L'analyse génétique serait seule en mesure de déterminer pour une souche donnée quel est son taux de mutation. Nous inclinons à penser que l'ancienneté de l'isolement intervient pour favoriser la production des mutants rhamnose +. Toutes les souches étudiées par Englesberg, Brygoo et Courdurier et nous-mêmes avaient subi de nombreux repiquages ; aucune ne sortait directement de l'organisme. Or, parmi les 22 rhamnose + de notre laboratoire, nous en relevons 11 sur un lot de 27 provenant de Hambourg, et dont l'isolement a eu lieu entre 1900 et 1920. Il importerait, en suivant la technique d'Englesberg, de rechercher si le caractère muté est définitif et si le passage par l'animal ne provoquerait pas sa réversion.

LE TEST « RHAMNOSE » (BEZSONOVA) GARDE SA VALEUR PRATIQUE. — Si du point de vue doctrinal, l'absence de fermentation du rhamnose par le bacille pesteux ne peut plus être rigoureusement soutenue, au moins pour des souches de collection, la réaction de Bezsonova pour le différencier de l'agent de la pseudotuberculose ne perd rien de son intérêt pratique. A cet égard, nous renvoyons au rapport que nous avons rédigé lors de la réunion en 1952 du Comité d'Experts de la Peste [8]. Ce document comporte, en annexe, le détail de la technique recommandée dans un but d'uniformisation ; elle s'inspire de la conception et de la formule de Bezsonova, et le résultat est acquis en vingt-quatre ou quarante-huit heures. S'il y a doute, avons-nous ajouté (en envisageant les réactions positives tardives avec *P. pestis*) nous préconisons l'exécution d'un test parallèle dans le milieu *dépourvu d'indicateur*. Après trois jours d'incubation, on l'additionnera de IV gouttes de rouge de méthyle. Seule *P. pseudotuberculosis* acidifie suffisamment le milieu pour l'amener au pH de 4 à 4,5 qui provoque le virage au rouge ; avec *P. pestis*, la couleur sera jaune ou orange (pH entre 5 et 6). Nous le comprenons, après l'étude d'Englesberg dont les données manométriques ont démontré l'attaque incomplète du rhamnose par le bacille pesteux.

RÉSUMÉ. — Des mutants rhamnose positifs peuvent être détectés dans toutes les souches de *P. pestis* qui, normalement, sont sans action sur ce glucide. Un milieu d'Endo rhamnosé provoque l'apparition régulière de ces mutants après un temps variable (une à deux semaines) d'après Englesberg. En milieu liquide, des mutants ont été observés par Brygoo et Courdurier, mais de façon moins constante ; ceux-ci, repiqués après purification, attaquent ensuite le rhamnose rapidement par un mécanisme adaptatif. Mais cette fermentation reste incomplète

comparée à celle du glucose. Le taux de mutation n'a pas été déterminé, mais à l'instar de ce que l'on sait des mutations spontanées, il doit être très bas, ce qui explique l'irrégularité de leur détection dans les milieux liquides, pour une même souche.

Ces constatations n'enlèvent rien à la valeur pratique de la réaction de Bezsonova pour la différenciation *P. pestis*-*P. pseudotuberculosis*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRYGOO (E. R.) et COURDURIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 688.
- [2] VOURLOUDE. *Centralbl. Bakt. I Orig.*, 1908, **45**, 195.
- [3] SWELLENGREBEL et HOESEN. *Centralbl. Bakt. I Orig.*, 1915, **75**, 456.
- [4] AUNOY (R. d'). *J. inf. Dis.*, 1923, **33**, 390.
- [5] ENGBERG (E.). *Bact. Proc.*, 1955, 66.
- [6] ENGBERG (E.). *Ann. Rep. Biolog. Labor.*, 1954-1955, 27-29. Long Island Biolog. Ass. New-York.
- [7] DEVIGNAT (R.). *Rev. suisse Path. gén. Bact.*, 1953, **46**, 509.
- [8] GIRARD (G.). *Bull. O. M. S.*, 1953, **9**, 645.

AU SUJET DE LA DISPARITION DE LA LIGNINE DANS LES CULTURES DE *PSEUDOMONAS*

par M. RAYNAUD, G. FISCHER, A.-R. PRÉVOT et B. BIZZINI.

(Institut Pasteur)

Dans deux communications antérieures [1], nous avons étudié l'action de certaines bactéries sur divers types de préparations de lignine. Nous avons utilisé la technique de préparation de suspensions stables de lignine en milieu aqueux décrite par Waksman et Hutchings [2] et reprise par divers autres auteurs [3]. Cette technique consiste à verser dans de l'eau une solution alcoolique de lignine et à évaporer l'alcool par ébullition prolongée. Ajoutée à un milieu de culture minéral, cette préparation où la lignine constitue la seule source apparente de carbone permet la croissance de divers *Pseudomonas*. Si après huit à quinze jours de culture, on centrifuge les germes et que l'on dose la lignine résiduelle dans le milieu par la technique de Waksman et Hutchings [2], on trouve avec tous les *Pseudomonas* examinés que le taux de lignine a diminué, tombant souvent à zéro [2].

Cette constatation, basée sur une technique utilisée dans le cas des champignons par d'autres auteurs [3], nous avait autorisés à considérer ces bactéries comme ligninolytiques, d'autant que dans des expériences témoins faites avec d'autres espèces bactériennes (colibacille), on n'observe ni développement bactérien, ni baisse appréciable du taux de lignine dans le milieu.

La réalité de cette attaque de la lignine paraissait d'autant plus certaine que des suspensions bactériennes des mêmes *Pseudomonas*,

mises en présence de lignines diverses préparées selon le même procédé (suspensions aqueuses homogènes préparées à partir de solutions alcooliques), se montraient capables de consommer de fortes quantités d'oxygène dans des expériences manométriques.

Les enzymes responsables de cette attaque (qui n'est qu'apparente, comme nous le verrons plus loin) paraissaient même être adaptatifs, car seules les suspensions cultivées préalablement sur milieu à base de lignine étaient capables de consommer de l'oxygène en présence de suspensions aqueuses de lignine, sans latence, en expérience manométrique. Cependant, l'adaptation de ces bactéries à une molécule insoluble et volumineuse comme celle de la lignine paraissait difficile à admettre et Roger Stanier nous avait fait part, au cours d'une communication personnelle, des réserves qu'il fallait formuler à ce sujet.

Nous avons réexaminé le problème d'un point de vue critique et nous nous sommes demandé si l'élimination de l'alcool dans les conditions où nous opérons était bien complète.

Malgré une ébullition prolongée, et sans doute à cause du caractère colloïdal de la suspension, les dernières traces d'alcool sont difficiles à éliminer. Nous sommes arrivés à réaliser cette élimination par une dialyse prolongée (quatre jours contre eau courante et quatre jours contre eau distillée). Avec les suspensions stables de lignine ainsi obtenues, les *Pseudomonas* étudiés ne donnent plus lieu à aucune consommation d'oxygène dans l'appareil de Warburg. Ces souches sont donc incapables d'oxyder directement la lignine, dans des expériences faites avec les techniques manométriques.

Restait alors à expliquer l'attaque de la lignine observée en culture. La présence d'alcool résiduel expliquait bien la croissance microbienne observée, mais non la disparition de la lignine présente dans le milieu.

Nous avons pu trouver cette explication dans le fait suivant, déjà signalé par Day, Gottlieb et Pelczar [4] dans le cas de *Polyporus versicolor* : la lignine se fixe sur les bactéries et lorsqu'on centrifuge la culture finale, elle est éliminée avec les corps microbiens. Son titre dans le milieu baisse par rapport au milieu témoin, même ensemencé avec d'autres bactéries comme le colibacille, qui ne poussent pas suffisamment à partir des faibles quantités d'alcool présentes dans le milieu. On peut cependant récupérer la lignine à partir du culot bactérien en extrayant ce dernier à chaud par un solvant approprié (acétate d'éthyle). L'intervention de ces deux causes d'artifices techniques nous amène donc à reconsidérer les conclusions de nos articles antérieurs. Aucune des techniques décrites par nous-mêmes [1] ou par d'autres auteurs [2] ne permet de déceler une attaque bactérienne de la lignine et les *Pseudomonas*, que nous avons considérés dans leur ensemble comme ligninolytiques, sont dépourvus du pouvoir de dégrader la lignine.

Nous avons utilisé les suspensions aqueuses de lignine longuement dialysées et dépourvues de toute trace d'alcool comme seule source de carbone ajoutée à divers milieux d'isolement, en particulier à des gels de silice, pour tâcher d'obtenir à partir de sources diverses, des bactéries ligninolytiques, sans y parvenir.

Ces résultats négatifs ne permettent pas d'affirmer que des bactéries capables d'attaquer la lignine n'existent pas dans la nature, mais la

preuve de cette existence, que nous croyions avoir apportée, reste à faire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] RAYNAUD (M.), BIZZINI (B.), FISCHER (G.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 1. — FISCHER (G.), BIZZINI (B.), RAYNAUD (M.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 618. — PRÉVOT (A.-R.), FISCHER (G.), BIZZINI (B.) et RAYNAUD (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 743.
- [2] WAKSMAN (A. S.) et HUTCHINGS (J. I.). *Soil. Sci.*, 1936, **42**, 119.
- [3] FISCHER (G.). *Arkiv. Micr.*, 1953, **18**, 397. Dissertation. Stuttgart, 1952. — GOTTLIEB (S.) et PELCZAR (M. J.). *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 55. — VAN VLIET (W. F.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1954, **15**, 211.
- [4] DAY (W. C.), GOTTLIEB (S.) et PELCZAR (M. J.), cité in GOTTLIEB (S.) et PELCZAR (M. J.). *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 55.

**ÉTUDE DES AGGLUTININES AMIDON ET LEVURE
CHEZ LE LAPIN.
LEUR PARENTÉ AVEC LES AGGLUTININES TYPHIQUES**
(Note préliminaire),

par ALBERT DELAUNAY, MONIQUE PELLETIER, MICHELLE HÉNON
et SUZANNE BAZIN.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches, et C. N. R. S.)

Nous avons montré, dans des notes antérieures, que de nombreux sérums de lapins *normaux* ont le pouvoir d'agglutiner très fortement des grains d'amidon de riz [1] ou des cellules de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) [2]. Nous avons aussi montré que ces agglutinines naturelles ont entre elles de nombreux traits communs mais qu'il est difficile, voire impossible, de les identifier.

Quelle nature leur reconnaître? Méritent-elles d'être considérées comme de véritables anticorps? Ne s'agit-il pas plutôt de protéines spéciales, sans lien de parenté véritable avec l'amidon et la levure, capables seulement de se fixer sur ces substrats, un peu comme le font la properdine sur le zymosan ou la « C-reactive-protein » sur le polysaccharide C du pneumocoque? Nous nous efforçons à l'heure actuelle de résoudre ce problème. Nous sommes encore loin de la solution, mais il est remarquable que le déroulement de nos recherches ne cesse de nous mener à des observations très inattendues. Dans ce travail, nous rapporterons brièvement ce que nous avons trouvé en étudiant les agglutinines amidon et levure comparativement avec les agglutinines typhiques.

Ici, c'est une fois de plus le seul hasard qui a guidé nos premiers

pas. Nous avons ajouté, un jour, à un sérum de lapin normal, capable d'agglutiner très fortement des grains d'amidon de riz et des cellules de levure, quelques gouttes d'une endotoxine typhique. Surprise. Nous voyons le sérum en question perdre *immédiatement* son pouvoir d'agglutiner amidon et levure, le premier corps totalement, le second en partie.

Qu'avait-il pu se passer? Nous avons fait sur le champ bien des hypothèses qu'il nous paraît inutile de présenter ici. Qu'il nous suffise de dire que, peu à peu, nous avons été conduits à imaginer qu'il existait entre les agglutinines amidon et levure d'une part, l'agglutinine typhique de l'autre, une certaine parenté. Mais de quel ordre? Pour le savoir, nous avons entrepris un grand nombre d'expériences. Voici, très sommairement exposés, leurs résultats.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES.

AGGLUTINATION DE L'AMIDON DE RIZ. — Technique sur lames. Dans 0,2 ml d'un sérum de lapin plus ou moins dilué est déposé 0,01 ml d'une suspension en eau physiologique de grains d'amidon (2 g pour 150 ml d'eau). Le mélange est fait soigneusement par agitation ménagée de la lame. Puis, examen immédiat au microscope.

AGGLUTINATION DES CELLULES DE LEVURE (*Saccharomyces cerevisiae*). — Technique calquée, point par point, sur la précédente. La suspension de cellules de levure a la même concentration que la suspension d'amidon (ce qui correspond environ à 2 millions de cellules par millilitre).

AGGLUTINATION DES BACILLES TYPHIQUES. — Nous avons utilisé ici les techniques les plus classiques. a) *Examen sur lames*: Un nombre approprié de bacilles typhiques vivants, porteurs des antigènes O et H, est déposé entre lame et lamelle dans du sérum de lapin plus ou moins dilué; examen de la préparation en contraste de phase après un séjour de trente minutes à 37°. b) *Examen en tubes*: Étude de l'agglutination O ou H après centrifugation d'une suspension bacillaire dans un sérum de lapin plus ou moins dilué.

MODE DE PRÉPARATION DE L'ENDOTOXINE TYPHIQUE. — Technique classique de A. Boivin.

MODE DE PRÉPARATION DES IMMUNOSÉRUMS DE LAPINS. — a) *Immunisation par des bacilles typhiques*. — Technique classique. Six injections intrapéritonéales puis intraveineuses (deux par semaine) d'une suspension en eau physiologique de bacilles typhiques tués. Une semaine de repos puis saignée à blanc des animaux.

b) *Immunisation par des cellules de levure*. — Six injections intrapéritonéales, à raison de deux par semaine, de 5 ml d'une suspension de levure dans l'eau physiologique (2 g pour 150 ml). Une semaine de repos puis saignée à blanc des animaux.

c) « *Immunisation* » par des grains d'amidon de riz. — Technique calquée sur celle utilisée pour les cellules de levure.

MODES D'ÉPUISEMENT DES SÉRUMS. — a) *Par l'amidon*. — 1 ml de sérum pur (sérum normal) ou dilué (immunsérum) est traité par le culot provenant de la centrifugation de 7,5 ml d'une suspension d'amidon de riz (soit 0,1 g). Le mélange est soigneusement fait. La préparation est laissée une heure à la température du laboratoire puis centrifugée. Examen du sérum surnageant. Selon les cas, nous avons fait 1 ou 2 épuisements.

b) *Par la levure*. — Même technique que pour l'amidon.

c) *Par les bacilles typhiques*. — Technique classique mettant en jeu des germes vivants ou tués. Sérums dilués ou non.

RÉSULTATS.

I. TENEUR DU SÉRUM DE LAPINS « NORMAUX » EN AGGLUTININES AMIDON, LEVURE, TYPHIQUES. — 1° La plupart des sérums que nous avons examinés contenaient à la fois des *agglutinines amidon*, *levure* et *typhiques*. Dans quelques cas, pourtant, les agglutinines amidon ou levure ont fait pratiquement défaut. De même, l'agglutinine H. L'agglutinine O a toujours été trouvée mais parfois à un titre très faible.

2° A de rares exceptions près, nous avons pu noter un rapport étroit entre le titre de l'*agglutinine amidon* et celui de l'*agglutinine typhique* (O). En règle générale, on peut dire que les sérums de lapins « normaux » qui agglutinent le mieux les bacilles typhiques (antigène O) sont aussi ceux qui agglutinent le mieux les grains d'amidon de riz (l'agglutination pouvant encore être observée avec des sérums dilués trois cents fois).

3° Assez souvent, un titre en *agglutinine levure* assez élevé va de pair avec un titre assez élevé en *agglutinine amidon*. Mais nombreuses sont les exceptions (on peut trouver, par exemple, un titre élevé en agglutinine amidon et un titre bas en agglutinine levure, l'inverse étant également vrai).

4° La même remarque peut être faite quand on étudie comparativement l'*agglutinine levure* et l'*agglutinine typhique* O. Titres correspondants dans certains cas, différents dans des cas plus nombreux.

II. ACTION DE L'ENDOTOXINE TYPHIQUE SUR LES AGGLUTININES AMIDON, LEVURE ET TYPHIQUE (O) PRÉSENTS DANS DES SÉRUMS DE LAPINS « NORMAUX ». — Sont réunis en tube 0,9 ml de sérum et 0,1 ml d'eau physiologique contenant en solution 2 mg par millilitre d'endotoxine typhique. C'est sur ce mélange aussitôt fait que sont effectuées les réactions d'agglutination. Précisons que, pour ces expériences, ont été seulement utilisés au départ des sérums qui étaient à la fois riches en agglutinines amidon, levure et typhique O. Résultats.

1° L'addition de l'*endotoxine typhique* à des sérums normaux de lapin entraîne, dans ces sérums, une diminution, parfois même une disparition totale, de l'*agglutinine typhique* O.

2° L'addition de la même *endotoxine* entraîne presque toujours, dans les mêmes conditions, une disparition de l'*agglutinine amidon*.

3° Il est rare, cependant, que l'*endotoxine typhique* entraîne la disparition de l'*agglutinine levure*. Ce qu'on observe dans l'immense majorité des cas, c'est une simple diminution du titre de cette agglutinine.

III. RECHERCHE DES AGGLUTININES TYPHIQUE (O), AMIDON ET LEVURE, APRÈS ÉPUISEMENT CROISÉ DE SÉRUMS DE LAPINS « NORMAUX ». — 1° Les sérums de lapins normaux, *épuisés par l'amidon*, perdent :

Complètement leur agglutinine amidon,
Complètement leur agglutinine typhique,
Partiellement leur agglutinine levure.

2° Les sérums de lapins normaux, *épuisés par les bacilles typhiques*, perdent :

Complètement leur agglutinine typhique,
Complètement leur agglutinine amidon,
Partiellement leur agglutinine levure.

3° Les sérums de lapins normaux, *épuisés par les cellules de levure*, perdent :

Complètement leur agglutinine levure,
Partiellement leur agglutinine amidon,
Partiellement leur agglutinine typhique.

IV. MODIFICATIONS DU TITRE D'UN SÉRUM DE LAPIN EN AGGLUTININES TYPHIQUES, AMIDON ET LEVURE, APRÈS « IMMUNISATIONS » CROISÉES. — 1° Après *immunisation* des lapins par des *bacilles typhiques*, on observe à la fois, dans les sérums des animaux, une *augmentation considérable du titre des agglutinines typhiques, amidon et levure*.

Donnons ici quelques chiffres.

	TITRE avant immunisation	TITRE après immunisation
Agglutinine amidon	1/200	1/12 800
Agglutinine levure	1/100	1/ 1 600
Agglutinine typhique O	1/ 20	1/12 800
Agglutinine typhique H	1/ 20	1/51 200

Quand on opère sur un immunosérum dilué au préalable cent fois par de l'eau physiologique, on peut, au prix de 2 *épuisements par les bacilles typhiques*, éliminer complètement les agglutinines typhiques, amidon et levure. En mettant en œuvre *l'amidon*, on élimine complètement l'agglutinine amidon mais on ne touche pas aux agglutinines typhiques et levure. *Par la levure*, enfin, on élimine complètement l'agglutinine levure mais on ne touche pas aux agglutinines typhiques et amidon.

Quand on opère sur un immunosérum qui a été dilué au préalable cinq cents fois, on n'élimine pas davantage, au prix de 2 *épuisements par l'amidon*, les agglutinines typhiques.

2° L'injection, chez des lapins, de grandes quantités de *grains d'amidon de riz n'augmente pas ou augmente à peine*, dans le sérum de ces animaux, le titre en agglutinine amidon.

Elle laisse, *inchangés*, les titres en agglutinines typhiques et levure.

3° Après *immunisation* des lapins par des *cellules de levure*, on observe à la fois, dans le sérum de ces animaux, une *augmentation considérable du titre de l'agglutinine levure*, une *augmentation faible de l'agglutinine amidon* et encore plus faible de l'agglutinine typhique O.

Donnons quelques chiffres en exemple :

	TITRE avant immunisation	TITRE après immunisation
Agglutinine amidon	1/80	1/400
Agglutinine levure	1/20	1/3 200
Agglutinine typhique	1/20	1/40

CONCLUSIONS.

1° Dans les sérums de lapins « normaux », coexistent presque toujours des agglutinines amidon, levure et typhiques (O et H). Souvent, mais non toujours, le titre en agglutinine amidon est proche du titre en agglutinine typhique O ; il peut être aussi proche de l'agglutinine levure, mais ce fait demeure assez rare.

2° Un sérum de lapin normal, traité par une dose appropriée d'endotoxine typhique, perd en général complètement ses agglutinines typhique (O) et amidon. Il ne perd que partiellement son agglutinine levure.

3° Un sérum de lapin normal, épuisé par l'amidon ou des bacilles typhiques, perd à la fois ses agglutinines typhique (O) et amidon. Il ne perd que partiellement son agglutinine levure. Le même sérum, épuisé par la levure, perd totalement son agglutinine levure mais, seulement en partie, ses agglutinines amidon et typhique (O).

4° L'injection chez des lapins de bacilles typhiques tués détermine à la fois une augmentation considérable des agglutinines typhiques (O et H), amidon et levure. L'injection chez les mêmes animaux de grains d'amidon de riz laisse pratiquement inchangé le titre de ces agglutinines. L'immunisation par des cellules de levure provoque une forte augmentation de l'agglutinine levure mais modifie à peine le titre des agglutinines amidon et typhique (O).

5° Peut-on, en se fondant sur les résultats que nous venons de présenter, admettre qu'il y a des liens de parenté entre, d'une part l'agglutinine typhique et de l'autre les agglutinines amidon et levure ? Certains le penseront peut-être, faisant du même coup des agglutinines amidon et levure de véritables anticorps naturels. Pour notre part, nous préférons nous limiter dans ce travail au simple exposé des faits découverts (ils sont assez curieux par eux-mêmes) en renonçant, pour le moment, à l'accompagner de toute interprétation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DELAUNAY (A.), HENON (M.), PELLETIER (M.) et BAGGI (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2094.
- [2] DELAUNAY (A.), HENON (M.), PELLETIER (M.) et BAZIN (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 675. — DELAUNAY (A.), HENON (M.) et BAZIN (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1858.

ÉTUDE DES AGGLUTININES AMIDON ET LEVURE DANS LES SÉRUMS HUMAINS

(Note préliminaire),

par ALBERT DELAUNAY, MONIQUE PELLETIER, MICHELLE HÉNON
et FRANCINE TOULLET.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches, et C. N. R. S.)

Nous avons montré, au cours de notes antérieures [1], qu'il existe, dans de nombreux sérums *normaux*, des globulines particulières capables d'agglutiner des grains d'amidon (de riz, de maïs et de froment) et des cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Récemment, en étudiant des *sérums de lapins*, nous avons été conduits à nous demander si les agglutinines en question n'avaient pas des liens de parenté avec les agglutinines typhiques [2]. Nous voudrions dire ici ce que nous avons appris, presque au même moment, en examinant des sérums humains. On verra, une fois de plus, qu'il s'agit de faits assez surprenants.

Notre examen a porté jusqu'à présent sur *plus de 700 sérums humains*. Les uns provenaient de sujets normaux, les autres de sujets malades. Tous ont été utilisés, moins de trois jours après la prise de sang. Les réactions d'agglutination dont nous nous sommes servis, tant pour l'amidon que pour la levure, ont été celles que nous utilisons depuis le début de nos recherches en ce domaine [1].

Voici quelles ont été, avec les sérums humains, nos principales observations.

1° Les agglutinines amidon et levure peuvent manquer ou du moins se trouver à un titre très faible (\pm) dans des sérums humains. L'agglutinine-amidon fait plus souvent défaut que l'agglutinine-levure. Quand elle existe, elle dépasse rarement +++ (rappelons que, pour les sérums de lapins normaux, il est fréquent de trouver une agglutination massive que nous indiquons par +++++). L'agglutinine-levure, de son côté, peut être, quand elle existe, d'intensité variable. Parfois, elle est forte (++++).

Fait très remarquable : il n'y a, dans les sérums humains, *aucun parallélisme* entre l'agglutinine-amidon et l'agglutinine-levure. L'une peut parfaitement exister — et à un titre élevé (Cf. agglutinine-levure) — sans l'autre.

2° Les agglutinines amidon et levure ne sont pas modifiées par le chauffage des sérums humains (une heure à 56°).

3° Nous avons conservé des sérums humains pendant trois mois à +4°. Ce vieillissement n'a pas modifié le titre initial de l'agglutinine-amidon. Il a diminué de façon assez nette le titre de l'agglutinine-levure.

4° L'addition de citrate de sodium (1 ml de sérum + 0,1 ml d'une

solution à 5 p. 100 de citrate de sodium) à un sérum humain ne touche pas à l'agglutinine-levure ; il augmenterait légèrement le titre de l'agglutinine-amidon.

5° L'importance du titre en agglutinine-amidon ou en agglutinine-levure dans un sérum humain ne paraît avoir aucune relation avec le sexe du sujet fournisseur du sérum, les groupes sanguins et la vitesse de sédimentation des hématies.

6° *Rapports des agglutinines amidon et levure avec l'agglutinine typhique O.* — a) Nous nous rappelons que, sans être absolument étroits, ces rapports, étudiés sur le sérum de lapin, apparaissent remarquables [2]. En est-il de même chez l'homme ? Non. *Dans les sérums humains, ni l'agglutinine-amidon ni l'agglutinine-levure ne paraissent avoir de rapport avec l'agglutinine typhique O.* Voici, en exemple, quelques titres trouvés (tableau I) ; on remarquera leur indépendance.

b) On sait par ailleurs [2] que l'addition de quelques milligrammes

TABLEAU I.

<u>Numéro du sérum étudié</u>	<u>Titre de l'agglutinine amidon</u>	<u>Titre de l'agglutinine levure</u>	<u>Titre du sérum en agglutinine typhique O</u>
H 9	0	0	I/80
H 28	0	0	I/20
H 369	+	0	I/800
H 374	++	+++	I/10
H 375	+	+++	
H 380	++++	++++	I/20
H 412	0	+	I/130
H 423 bis	++	++++	I/10

d'endotoxine typhique à un sérum de lapin normal entraîne immédiatement la perte totale des agglutinines typhique et amidon, une perte au moins partielle de l'agglutinine-levure. En est-il de même quand on se sert d'un sérum humain ? En aucune manière. Il suffit pour le reconnaître de regarder notre tableau II. (Précisons que le traitement des sérums par l'endotoxine a eu lieu dans les conditions suivantes : à 0,9 ml de sérum humain non dilué a été ajouté 0,1 ml d'une solution renfermant 2 mg d'endotoxine typhique par millilitre. Les réactions d'agglutination [amidon, levure, typhique] sont faites, dans les conditions habituelles, aussitôt après la préparation des mélanges.)

Après lecture de ce tableau, les conclusions suivantes s'imposent :

L'addition de l'endotoxine typhique à un sérum humain entraîne la disparition (quand il existe) de l'anticorps O correspondant (nos expériences, ici, ont dû être limitées car, si extraordinaire que cela paraisse, nous n'avons trouvé qu'exceptionnellement des sérums qui recélaient de l'anticorps O antityphique).

La même addition augmente le titre de l'agglutinine-amidon ou même fait apparaître celle-ci ($O \rightarrow ++$). Ici, 19 expériences ont eu lieu qui ont donné 19 résultats du même ordre.

La même addition enfin laisse inchangé le titre en agglutinine-levure (19 essais).

Comment ne pas être déconcerté par le second de ces résultats ? Il est exactement à l'opposé de celui trouvé chez le lapin.

TABLEAU II.

Numéro du sérum étudié	Titre de l'agglutinine amidon		Titre de l'agglutinine levure		Titre de l'agglutinine typhique (O)	
	sérum normal	sérum + endotoxine	sérum normal	sérum + endotoxine	sérum normal	sérum + endotoxine
H 455	O	++	O	O	O	O
H 465	O	++	++	++	O	O
H 466	O	++	+++	+++	I/O	O
H 469	O	+	O	O	O	O
H 472	O	+	O	O	O	O
H 473	O	+	+	+	O	O

c) Ces différents faits une fois connus, nous estimions presque avoir démontré que, chez l'homme, il n'y a aucune identité entre les trois agglutinines dont il est ici question. Mais comme il est dit qu'en ce domaine tout relèverait de l'inattendu, nous devions soudain retrouver, au cours d'expériences d'épuisement, des résultats semblables à ceux découverts chez le lapin. En effet, des sérums humains judicieusement choisis étant en cause, nous avons pu les épuiser :

a) Par l'amidon ou les bacilles typhiques, en agglutinines amidon et typhique (totalement) et en agglutinine-levure (partiellement) ;

b) Par la levure, en agglutinine-levure (totalement), en agglutinines amidon et typhique (partiellement).

Quelle interprétation générale donner à tous ces faits ? Nous l'ignorons.

7° Variations des titres en agglutinine-amidon et en agglutinine-levure selon la provenance des sérums. — Ayant titré un lot de 150 sérums « normaux », nous n'avions trouvé aucun titre en agglutinine-amidon supérieur à $+\pm$; cependant, 30 p. 100 de ces sérums dépassaient ce titre en agglutinine-levure. Des essais comparatifs faits au même moment avec des sérums provenant de sujets malades ont donné les pourcentages suivants :

a) 25 sujets atteints de rhumatisme articulaire aigu. — Pourcentage de sérums ayant un titre supérieur à $+\pm$ en agglutinine-amidon : 68 p. 100 ; en agglutinine-levure : 88 p. 100.

b) 45 sujets atteints de tuberculose pulmonaire en évolution. — Pourcentage de sérums ayant un titre supérieur à $+\pm$ en agglutinine-amidon : 15,5 p. 100 ; en agglutinine-levure : 53,3 p. 100.

Autrement dit, des sérums normaux aux sérums pathologiques, l'indice statistique passe, pour l'amidon, de 0 à 2,03, pour la levure de 1,4 à 3,21. Ce qui est effectivement remarquable. Malheureusement, en ce cas encore, nous n'avons aucune explication à donner.

8° Dernière remarque qui nous paraît digne d'être soulignée. Chez le lapin laissé au repos, les titres en agglutinines amidon ou levure varient peu d'une saignée à l'autre. Chez l'homme, au contraire, des fluctuations frappantes peuvent être trouvées aussi bien pour la levure que pour l'amidon et, cela, en moins d'une semaine. Le titre en agglutinine-amidon, par exemple, peut, en quinze jours, être successivement de ++, puis de 0, puis de +, le titre en agglutinine-levure de 0, puis de + + + +, puis de +. Il y a là encore un mystère.

RÉSUMÉ.

Des sérums humains peuvent, spontanément, agglutiner les grains d'amidon et les cellules de levure ; cela, tout spécialement quand ils proviennent de sujets atteints d'affections fébriles.

Les agglutinines amidon et levure, chez l'homme, ne paraissent avoir aucun lien de parenté avec l'agglutinine typhique O, ce qui les distingue des mêmes agglutinines trouvées chez le lapin. Des épaissements croisés sont cependant possibles.

Le titre des agglutinines amidon et levure, chez l'homme, subit des fluctuations rapides dont la cause échappe encore totalement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DELAUNAY (A.), HENON (M.), PELLETIER (M.) et BAGGI (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2094. — DELAUNAY (A.), HENON (M.), PELLETIER (M.) et BAZIN (S.) *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 675. — DELAUNAY (A.), HENON (M.) et BAZIN (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1858.
- [2] DELAUNAY (A.), PELLETIER (M.), HENON (M.) et BAZIN (S.). *Ann. Inst. Pasteur* (sous presse).

(Suite et fin de la séance en septembre.)

LIVRES REÇUS

E. A. Kabat. — *Blood groups. Their chemistry and immunochemistry.* 1 vol., 330 p., Acad. Press Inc., édit., New-York, 1956. Prix : 8 dollars.

Un ouvrage résumant nos connaissances sur les antigènes de groupes sanguins manquait encore à la collection des traités d'immunologie et précis d'immuno-hématologie. Kabat était l'un des rares auteurs qui pouvaient traiter le sujet avec maîtrise et clarté.

Le premier chapitre constitue un exposé des notions essentielles de biologie des antigènes érythrocytaires : iso-immunisation, tolérance

immunitaire, auto-anticorps et anémie hémolytique. Le second chapitre expose les méthodes et techniques sérologiques, immunochimiques et enzymatiques. Les chapitres III et IV traitent des sources et de la purification des substances de groupes sanguins. Les chapitres V, VI et VII concernent la composition chimique et le degré de pureté des substances, puis leurs analogies et différences du point de vue immuno-chimique. Le chapitre VIII résume la conception que l'on peut actuellement avoir sur leur structure, notamment en faisant intervenir une hydrolyse acide ménagée ou l'action d'enzymes spécifiques, ainsi que l'inhibition des anticorps par des sucres simples. Le chapitre IX est réservé aux agglutinines et à leur action biologique. Le dernier chapitre souligne l'importance de ces antigènes en biologie, et notamment les relations étroites qu'ils possèdent avec les inhibiteurs des virus.

Un index de 15 pages et une bibliographie très complète, c'est-à-dire qui n'est pas limitée aux publications anglo-saxonnes, complète cette excellente monographie. A. E.

J. P. Sisley. — *Index des huiles sulfonées et détergents modernes*, tome 2, 1 vol., 567 pages. Editions Teintex, Paris, 1954.

Ce volume décrit près de 3 000 nouveaux produits non référenciés dans le premier tome et réunit les marques commerciales les plus importantes proposées actuellement sur le marché mondial par plus de 250 firmes. Conçu sur le plan du premier tome, il brosse tout d'abord un tableau du développement spectaculaire de l'industrie des composés superficiellement actifs, rappelle les domaines — divers et multiples — d'application de ces substances, et compare les avantages et inconvénients des savons, des détergents (dénommés plus justement saponides) et de leurs mélanges. Un chapitre important est consacré aux détergents additionnels et synergiques grâce auxquels des combinaisons de propriétés, parfois inattendues, peuvent être réalisées.

L'essentiel du volume est consacré à deux classifications des savons et saponides. Une *classification chimique* présente successivement les produits à anions actifs, les produits à cations actifs et les produits sans ions actifs. Chaque fois, l'auteur décrit les principes généraux de préparation et de fabrication ainsi que les applications essentielles. Une *index alphabétique* des marques commerciales des saponides et de leur mélange fournit, pour chacune d'elles, la composition, la classe chimique, les propriétés, les applications essentielles. Une liste des produits actuellement fabriqués en France termine ce tome.

Conçu et remarquablement réalisé comme une encyclopédie, cet ouvrage de près de 600 pages est un guide parfaitement clair et précis pour quiconque — industriel, chimiste ou chercheur — est appelé à tirer parti des propriétés étonnantes des savons et saponides.

J. J

Le Gérant : G. Masson.